

Tesis presentada para optar al grado de Doctor de la Facultad de
Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata

**“Estudio de los mecanismos de procesamiento
de microARNs en plantas de naranjo dulce
infectadas con el virus de la Psorosis de los
cítricos”**

Lic. Facundo E. Marmisolle
Directora: Dra. Carina A. Reyes
Co-directora: Dra. Carmen Hernández Fort

Marzo 2020

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (CCT-La Plata-CONICET) del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. Carina Andrea Reyes Martínez y co-dirección de la Dra. María Del Carmen Hernández Fort

Índice

ABREVIATURAS	10
ACRÓNIMOS VIRALES	12
INTRODUCCIÓN GENERAL	13
I. Historia de la Virología vegetal	13
II. El cultivo de cítricos en Argentina	14
III. La enfermedad psorosis de los cítricos	15
III. I. Sintomatología y espectro de hospedantes	16
III. II. El virus de la psorosis de los cítricos (CPsV)	18
III. II. A. Organización genómica de CPsV	19
III. II. B. Localización subcelular de las proteínas de CPsV	21
IV. Silenciamiento génico mediado por ARN: regulación génica	22
V. Biogénesis de microARNs en plantas	23
V. I. Transcripción de genes MIR	24
V. II. Procesamiento de pri-miARNs	26
VI. Formación del complejo RISC y moléculas efectoras	30
VII. Proteínas involucradas en la biogénesis y función de miARNs	31
VII. I. Dicer-like 1, DCL1	31
VII. II. Hyponastic Leaves 1, HYL1	34
VII. III. Serrate, SE	35
VII. IV. Argonauta 1, AGO1	37
VIII. Alteración del silenciamiento génico durante la infección viral	38
VIII. I. Supresión del TGS	40
VIII. II. Unión o corte de ARNdh	40
VIII. III. Interferencia con DCL2/3/4, AGO1 y con el ensamble del RISC	41
VIII. IV. Interferencia con el silenciamiento mediado por miARNs	42
VIII. V. Interferencia con HEN1 y secuestro de siARNs	43
VIII. VI. Interferencia con la amplificación del silenciamiento por sARNs; vía RDR/SGS3	44
IX. Las proteínas de CPsV como supresoras del silenciamiento por ARN	45
HIPOTESIS GENERAL	47
OBJETIVOS GENERALES	48
CAPÍTULO 1: Caracterización de 10 familias de pre-miARNs en plantas de naranjo dulce	49
Introducción	49

Objetivos.....	52
Resultados.....	53
I. Estudio de las familias de precursores de los miARNs: miR156, miR164, miR166, miR167, miR169, miR171, miR172, miR390, miR393 y miR403.....	53
I. I. Análisis de la conservación de secuencia de las familias de precursores estudiadas.....	53
I. I. A. Familia del miR156.....	54
I. I. B. Familia del miR164.....	55
I. I. C. Familia del miR166.....	55
I. I. D. Familia del miR167.....	56
I. I. E. Familia del miR169.....	57
I. I. F. Familia del miR171.....	57
I. I. G. Familia del miR172.....	58
I. I. H. Familia del miR390.....	59
I. I. I. Familia del miR393.....	59
I. I. J. Familia del miR403.....	60
I. II. Análisis de la conservación de secuencia de los miARNs maduros funcionales.....	61
I. III. Determinación del mecanismo de procesamiento de precursores basado en la estructura secundaria.....	64
I. III. A. Familia del miR156.....	64
I. III. B. Familia del miR164.....	65
I. III. C. Familia del miR167.....	65
I. III. D. Familia del miR166.....	67
I. III. E. Familia del miR169.....	70
I. III. F. Familia del miR171.....	71
I. III. G. Familia del miR172, miR390, miR393 y miR403.....	73
Discusión.....	75
CAPÍTULO 2: Estudio de la acumulación de pre-miARNs en muestras infectadas con CPsV y su interacción con proteínas virales.....	77
Introducción.....	77
Objetivos.....	78
Resultados.....	79
II. Estudio de la acumulación de pre-miARNs en muestras infectadas con CPsV y su interacción con proteínas virales.....	79
II. I. Cuantificación de pre-miARNs en plantas infectadas de naranjo dulce y su relación con la sintomatología.....	79
II. II. Ensayos de interacción de las proteínas virales con pre-miARNs en plantas de <i>N. benthamiana</i> mediante la metodología de RIP.....	83
II. II. A. Expresión transitoria e inmunoprecipitación de proteínas virales en plantas de <i>N. benthamiana</i>	83

II. II. B. Evaluación del enriquecimiento de pre-miARNs en muestras de <i>N. benthamiana</i> que sobreexpresan las proteínas virales	85
Discusión	88
CAPITULO 3: Estudio de la acumulación de transcritos <i>targets</i> de miARNs y su relación con la sintomatología en plantas de <i>Citrus sinensis</i> infectadas con CPsV...	90
Introducción	90
Objetivos.....	91
Resultados.....	92
III. Estudio de la acumulación de transcritos <i>targets</i> de miARNs y su relación con la sintomatología en plantas de <i>Citrus sinensis</i> infectadas con CPsV.....	92
III. I. Predicción bioinformática de los transcritos <i>targets</i> de miARNs en <i>C. sinensis</i>	92
III. II. Validación de <i>targets</i> mediante análisis de degradoma	94
III. III. Análisis de expresión de los <i>targets</i> de miARNs y su correlación con los síntomas	98
Discusión	101
CAPÍTULO 4: Análisis de interacción entre la proteína 24K^{CPsV} y proteínas de la maquinaria de procesamiento de miARNs	104
Introducción	104
La proteína 24K ^{CPsV}	104
Localización subcelular y patrones de expresión de DCL1, HYL1 y SE.....	105
Los <i>Dicing bodies</i> (D-bodies).....	106
Objetivos.....	107
Resultados.....	108
IV. Análisis de interacción entre la proteína 24K ^{CPsV} y proteínas de la maquinaria de procesamiento de miARNs	108
IV. I. Análisis bioinformático de la proteína 24K ^{CPsV}	108
IV. I. A. Señales de localización nucleares: NLS, NoLS y NES	108
IV. I. B. Predicción de regiones de unión a ácidos nucleicos.....	110
IV. I. C. Motivos GW/WG y dominios F-box	112
IV. II. Análisis de la interacción de la proteína viral 24K ^{CPsV} con proteínas de la maquinaria de procesamiento DCL1 ^{At} , HYL1 ^{At} y SE ^{At}	114
IV. II. A. Estudio de la expresión de las proteínas ensayadas	114
IV. II. B. Ensayos de co-localización entre 24K ^{CPsV} y las proteínas de la maquinaria de procesamiento	116
IV. II. C. Análisis de interacción de proteínas mediante ensayos de co-inmunoprecipitación (CoIP).....	118
IV. II. D. Análisis de interacción de proteínas mediante complementación bimolecular fluorescente (BiFC).....	120

IV. II. D. 1. Análisis de interacción entre mutantes de la proteína 24K ^{CPsV} y proteínas de la maquinaria de biogénesis de miARNs mediante BiFC.	125
Discusión	131
DISCUSIÓN GENERAL.....	134
PERSPECTIVAS.....	140
MATERIALES Y MÉTODOS	142
V. I. Materiales y Métodos	142
V. I. A. Reactivos químicos	142
V. II. B. Cepas bacterianas	142
V. I. C. Genomas	143
V. I. D. Secuencias aminoacídicas de las proteínas virales de ophiovirus que se utilizaron en los análisis bioinformáticos	143
V. I. E. Aislamientos de CPsV.....	144
V. I. F. Vectores de clonado.....	144
V. I. G. Plásmidos binarios.....	145
V. I. H. Cebadores	146
V. I. I. Sueros.....	148
V. I. J. Especies vegetales utilizadas y condiciones de crecimiento	149
V. II. Métodos.....	149
V. II. A. Inoculación de cítricos mediante injerto.....	149
V. II. B. Minipreparación de ADN plasmídico mediante lisis alcalina	150
V. II. C. Extracción de ARN de tejido vegetal	150
V. II. D. Digestión con ADNasa libre de ARNasa	150
V. II. E. Reacción de transcripción reversa (RT)	151
V. II. F. Reacción de PCR a tiempo final	151
V. II. G. PCR cuantitativa (qPCR)	152
V. II. H. Reacciones enzimáticas utilizadas en Ingeniería genética	152
V. II. H. 1. Desfosforilación de fragmentos de restricción.....	152
V. II. H. 2. Reacciones de ligación.....	153
V. II. H. 3. Digestión con enzimas de restricción.....	153
V. II. H. 3. 1. Digestión total	153
V. II. H. 3. 2. Digestión parcial.....	153
V. II. I. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa (<i>gene clean</i>)	154
V. II. J. Preparación y transformación de bacterias competentes	154
V. II. J. 1. Preparación de bacterias competentes para electrotransformación	154
V. II. J. 2. Preparación de bacterias competentes químicas	155

V. II. J. 3. Transformación de bacterias competentes	156
V. II. K. Colony-PCR	157
V. II. L. Agroinfiltración de hojas de <i>N. benthamiana</i>	157
V. II. M. Extracción de proteínas totales de tejido vegetal	157
V. II. N. Ensayos de RIP	157
V. II. N. 1. Crecimiento de plantas e infiltración	158
V. II. N. 2. Preparación de las <i>beads</i> del sistema GFP-Trap - Día 1	158
V. II. N. 3. Fijación- Día 2	159
V. II. N. 4. Preparación del extracto total	159
V. II. N. 5. Inmunoprecipitación.....	159
V. II. N. 6. Purificación de ARN.....	160
V. II. O. Co-inmunoprecipitación de proteínas: GFP-Trap	160
V. II. O. 1. Purificación de núcleos desde tejido de <i>Nicotiana benthamiana</i> ..	161
V. II. P. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE)	162
V. II. Q. Análisis de proteínas por <i>Western blot</i>	162
V. II. R. Microscopía de fluorescencia	163
V. II. S. Complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC)	164
V. II. T. Análisis bioinformáticos	164
V. II. T. 1. Predicción bioinformática de transcritos <i>targets</i>	164
V. II. T. 2. Análisis de degradoma mediante CleaveLand4	166
V. II. T. 3. Análisis bioinformático de las secuencias proteicas de <i>Ophiovirus</i>	167
BIBLIOGRAFÍA.....	168
ANEXO I	181
Publicaciones.....	181
ANEXO II (online).....	181

Abreviaturas

ADNc: ADN complementario
ADNdh: ADN doble hebra
AGO: Argonauta
AP2: *Apetala2-like transcription factor*
ARFs: *Auxin response factor*
ARNdh: ARN doble hebra
ARNm: ARN mensajero
ARNsh: ARN simple hebra
ARN pol II: ARN polimerasa II
BiFC: *Bimolecular fluorescence complementation*
CBs: *Cajal bodies*
CBC: *nuclear cap-binding complex*
CDK: *Cyclin-dependent Kinases*
CDS: *coding sequence*
CFP: *Cyan fluorescent protein*
CHRs: *chromatin remodelling factors*
CLSM: *Confocal laser scanning microscopy*
CP: Proteína de cubierta viral
CPLs: *C-terminal domain phosphatase-like*
CoIP: coinmunoprecipitación
COP1: *E3 ubiquitin ligase constitutive photo-morphogenic 1*
D-bodies: *Dicing bodies*
DCL: *Dicer like*
DExD/Helicasa : dominio helicasa
dsRBD: *dsRNA binding domain*
DO: Densidad óptica

Dpa: Días post agronifiltración
Dpi: Días post inoculación
FBP: *F-box protein*
FLIM: *Fluorescence-lifetime imaging microscopy*
FRET: *Fluorescence resonance energy transfer*
FTs: factores de transcripción
F-CPV-4: *flecking CPV-4*
F-90-1-1: *flecking 90-1-1*
GFP: *Green fluorescent protein*
HEN1: *Hua Enhancer 1*
HSP90: *Heat-Shock-Protein-90*
HYL1: *Hyponastic leaves-1*
kDa: *kilo Dalton*
miARN: *microRNAs*
MP: *Movement protein*
MPK3: *Mitogen-activated protein kinase 3*
NES: *nuclear export signal*
NLS: *Nuclear localization signal*
NoLS: *Nucleolar localization signal*
NOT2: *Negative On TATA Less 2*
NT: nucleótido
ON: *over night*
ORF: *open reading frame*
PAZ: *Piwi/Argonaute/Zwille*
PB: pares de bases
PP4: *Phosphatase 4*
PPI: *putative protein-protein interaction*

PTGS: *post transcriptional gene silencing*

pre-miARN: precursor de miARN

pri-miARN: transcripto primario de miARN

RDRp: *RNA dependent RNA polimerase*

RFP: *Red fluorescent protein*

RISC: *RNA induced silencing complex*

RIP: *RNA immunoprecipitation*

RNP: ribonucleoproteína

RT: Transcripción reversa

SCF: *S-phase kinase-associated protein 1 (SKP1)-cullin 1 (CUL1)-F-box protein (SCF) complex*

SE: *Serrate*

SMEK1: *Suppressor of MEK 1*

SCL: *Scarecrow-like*

SPL: *Squamosa promoter-binding protein-like*

sRNA: *small RNA*

siRNA: *short interference RNA*

ssRNA: *single strand RNA*

S-90-1-1: sintomatología de *shock*

TGS: *Transcriptional gene silencing*

Tm: temperatura de *melting*

vRNPs: *viral ribonucleoproteins*

VRCs: *Viral replication complexes*

VSRs: *Viral suppressor of RNA silencing protein*

vsiRNAs: *virus-derived small interference RNAs*

WT: wild-type

ZnF: *zinc finger domain*

Acrónimos virales

BIMaV: Blueberry mosaic associated virus

BYV: Beet yellow virus

CaLCuV: Cabbage leaf-curl virus

CaMV: Cauliflower mosaic virus

CLCuMuV: Cotton leaf-curl multan virus

CMV: Cucumber mosaic virus

CPsV: Citrus psorosis virus

MiLBVV: Mirafiori lettuce big-vein virus

ORMV: Oilseed rape mosaic virus

PLPV: Pelargonium line pattern virus

PVY: Potato virus Y

RSV: Rice strip virus

SPCSV: Sweet potato chlorotic stunt virus

TCV: Turnip crinkle virus

TBSV: Tomato bushy stunt virus

TGMV: Tomato golden mosaic virus

TMV: Tobacco mosaic virus

ToLCV-ND: Tomato leaf-curl New Delhi virus

ToRSV: Tomato ringspot virus

ZYMV: Zucchini yellow mosaic virus



INTRODUCCIÓN GENERAL

I. Historia de la Virología vegetal

La palabra “virus” es de origen latín y su significado es “jugo nocivo para la salud”, es decir, veneno. Los inicios de la virología vegetal se remontan a finales del siglo XIX. En aquella época las bacterias eran reconocidas como los agentes causantes de la mayoría de las enfermedades infecciosas de plantas y animales. Se suponía que las bacterias u otros microorganismos serían responsables de todas las enfermedades transmisibles.

Durante el año 1884, el microbiólogo francés Charles Chamberland inventó un filtro cuyo tamaño de poro fue inferior al de una bacteria. Así pues, podía hacer pasar por el filtro una solución con bacterias y eliminarlas completamente de ella. En 1887, el ruso Dimitri Ivanovski comenzó a investigar una peculiar enfermedad de tabaco, que se manifestaba por la formación de un extraño diseño con forma de mosaico sobre las hojas y a la que se refirió como “*wildfire*”, por la rapidez con la que se desarrollaba. Ivanovski sumergió hojas infectadas en un líquido para que se ablanden y obtuvo un extracto que filtró con un filtro de Chamberland. Encontró que el líquido que pasaba a través del filtro podía infectar a las plantas sanas y sugirió que la infección podría ser causada por una toxina producida por las bacterias. En 1899, el microbiólogo Martinus Beijerinck repitió los experimentos de Ivanovski y quedó convencido de que se trataba de una nueva forma de agente infeccioso. Comprobó que, a partir de la savia de una planta enferma, un número infinito de plantas sanas podían ser inoculadas e infectadas, con lo que concluyó que el agente infeccioso se reproduce en las plantas enfermas. Lo denominó *Contagium Vivum Fluidum* (germen vivo soluble), sustancialmente distinto a las bacterias debido a su carácter filtrable, a no ser visible en el microscopio y no cultivable *in vitro* (Beijerinck, 1898). Dicho germen es lo que actualmente conocemos como *Virus del Mosaico del Tabaco* (TMV, Tobacco mosaic virus).

Entre 1900 y 1930, fueron descritas muchas enfermedades virales, pero había una gran confusión por no poseer metodologías para distinguir un virus de otro. Un importante paso fue descubrir que los virus podían ser transmitidos de planta

a planta por medio de insectos. En 1931 se propuso el uso de plantas indicadoras, es decir, plantas que muestran sintomatología frente a infecciones virales, y reaccionan de manera diferente a distintos virus (hospedantes diferenciales), ayudando a la caracterización de estos agentes. En 1933, Wendell Stanley, siguiendo estudios químicos que le indicaban que los virus podían ser de naturaleza proteica, y junto al desarrollo de la ultracentrifugación, fue capaz de cristalizar TMV puro (Stanley, 1935). Además, su genoma viral fue el primer RNA en ser demostrado suficiente para lograr la infectividad, y su proteína de cubierta fue la primera proteína viral secuenciada.

Los años siguientes permitieron el desarrollo y mejoramiento de muchas técnicas, como la centrifugación en gradiente utilizada para la purificación de virus, el microscopio electrónico y la forma de preparación de las muestras, la cristalografía y la serología con la generación de anticuerpos monoclonales, entre otras. De esta forma se profundizó el estudio de las partículas virales, pudiéndose encontrar relaciones entre diferentes virus y especies. Posteriormente, la secuenciación de genomas completos permitió entender muchos aspectos de la virología como, (1), el número, tamaño y localización de los genes en el genoma (2), conocer la secuencia aminoacídica de proteínas conocidas o productos génicos, (3), predecir funciones de proteínas (4) determinar los mecanismos de transcripción, (5) determinar secuencias de regulación de la expresión y replicación de los genomas, (6) conocer elementos asociados con algunos virus (ARNs satélites), (7) analizar las bases moleculares de la variabilidad y adaptación evolutivas, y (8) dar comienzo de una taxonomía basada en relaciones evolutivas.

II. El cultivo de cítricos en Argentina

El término 'cítrico' se refiere al conjunto de especies e híbridos que pertenecen a los géneros *Citrus*, *Poncirus* y *Fortunella*, incluidos en la familia de las Rutáceas. La naranja dulce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) miembro de dicha familia, se cultiva en el Sur de China desde hace miles de años, desde donde se

extendió por todo el mundo. Actualmente, es una de las especies más importantes para el consumo de frutas por sus atributos nutricionales para la salud humana, por ser una excelente fuente de vitamina C de fácil acceso (Xu *et al.*, 2013). Además, posee una inmensa importancia económica ya que la producción de naranja a nivel mundial alcanzó el 53% del total de fruta cítrica fresca en el año 2017 (FEDERCITRUS, 2018) (Figura 1).

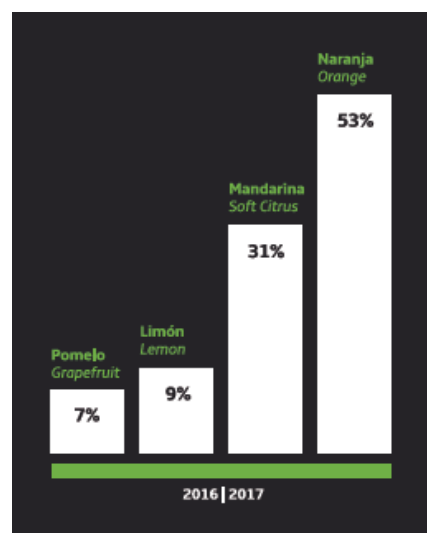


Figura 1: Producción mundial de fruta cítrica fresca. Argentina ocupa el 8vo lugar de ubicación con una producción de 3.284.000 Tn. (FEDERCITRUS, 2018)

La industria cítrica en Argentina ocupa el primer lugar en producción de frutas, seguido por frutas de pepita (manzanas y peras), duraznos, *berries* (arándanos, frutilla y frambuesa) y finalmente, uva de mesa. La producción de naranjo dulce en el país constituye el 31,3% del total, ocupando el segundo lugar por debajo del limón (51,2%), mientras que el resto se reparte entre mandarina (14%) y pomelo (3,5%). La superficie cítrica plantada en el año 2017 fue de 135.501 hectáreas, la mayor parte de ellas ubicadas en las provincias de Tucumán, Salta, Jujuy y Catamarca (NOA - 62%) y Entre Ríos, Corrientes, Misiones y Buenos Aires (NEA - 38%), alcanzando una producción de 3.284.000 Tn. Argentina cuenta con 5300 productores, 330 empaques para fruta cítrica, de los cuales 75 son para exportación, y 22 plantas industriales de procesamiento. En abril del año 2018 el valor de la producción del sector citrícola argentino se estimó en 1.178 millones de dólares (FEDERCITRUS, 2018).

III. La enfermedad psorosis de los cítricos

Psorosis es una de las enfermedades virales más antiguas de los cítricos, descrita en Florida (USA) en el año 1896 (Swingle y Webber, 1896). En 1932 se logró su transmisión por medio de injertos desde una planta enferma a una planta sana (Fawcett, 1932). En 1938 se describieron dos tipos de psorosis, denominadas psorosis A y psorosis B (Fawcett y Klotz, 1938). En un primer

momento, psorosis se agrupaba junto con otras enfermedades que presentaban síntomas comunes, ya que en árboles a campo no era posible distinguirlas. Un *test* realizado en base a pruebas biológicas denominadas de protección cruzada fue determinante para poder discriminar entre los virus de este grupo (Wallace, 1957).

Psorosis es una enfermedad transmisible principalmente por tejido vegetal, fundamentalmente cuando se realizan injertos para su comercialización y/o mejora. Por tal motivo, años atrás se transformó en una epidemia difundida principalmente por el uso de yemas infectadas y fue una de las principales causas de pérdidas económicas directas e indirectas del cultivo de los cítricos. Actualmente, se aplican programas de saneamiento basados en la utilización de yemas libres de virus y plantas de origen nucelar (Navarro *et al.*, 1980; Gómez, 2019) a fin de obtener cítricos libres de la enfermedad. Como consecuencia, a la fecha ya no es muy frecuente encontrar plantas con psorosis en Argentina gracias al Programa Nacional de Certificación. Sin embargo, los árboles aislados con psorosis que aún hoy se pueden hallar en regiones donde se viene aplicando dicho programa, demuestran otra clase de transmisión de la enfermedad, diferente al de las yemas, posiblemente algún insecto vector (Gómez, 2019). En apoyo a esta evidencia, varios investigadores proponen que la enfermedad se transmite naturalmente, de árbol a árbol, y que podría tratarse de alguna especie de pulgón (Pujol y Beñatena, 1965; Beñatena y Portillo, 1984; Danós, 1990; Costa *et al.*, 2013). En Texas, análisis espaciales y espacio-temporales en cultivos de cítricos con árboles infectados por psorosis, fueron consistentes con la propagación de la enfermedad a través de vectores, siendo otro candidato el hongo *Olpidium brassicae* (Gottwald *et al.*, 2005), pero estos ensayos preliminares tampoco han sido confirmados.

III. I. Sintomatología y espectro de hospedantes

La sintomatología característica de la enfermedad en plantas a campo se desarrolla de forma lenta, ya que el período entre la infección y la aparición de síntomas puede rondar entre los 10 a 15 años. Consiste en el descascarado del tronco principal y ramas, e incluso ramas delgadas y jóvenes; producción de

manchas gomosas en hojas adultas y síntomas foliares como flecos cloróticos y manchas en brotes jóvenes, que suelen desaparecer al madurar las hojas (Figura 2). En estados avanzados de la enfermedad, se acumula goma debajo del descascarado de las ramas y tronco, que impregna la madera y obstruye los vasos de conducción de agua, lo que provoca reducción del rendimiento, muerte de ramas y finalmente del árbol (Roistacher, 1991; Moreno *et al.*, 2015). Los síntomas foliares son también manifestados experimentalmente, inoculando por injerto plantas de semilla mantenidas en el invernáculo a una temperatura de entre 18-24°C, las cuales se podan luego de la inoculación (Roistacher, 1991).



Figura 2: Síntomas característicos de psorosis a campo. Paneles superiores: formación de gomosis y manchas cloróticas en hojas. Paneles inferiores: descamado de la corteza del tronco y ramas principales. Tomado de Gómez, 2019.

Cuando se realiza este ensayo, muchos aislamientos causan una reacción de *shock* con necrosis del brote en la primera brotación, seguida de flecos cloróticos (conocido como *Flecking*) y anillado foliar en las sucesivas brotaciones que se producen después de la poda. Existe gran variación en la intensidad de los síntomas de psorosis según las variedades afectadas, los aislamientos de virus presentes y la época del año, esto último relacionado a diferencias de temperatura e intensidad lumínica.

Todas las especies de los géneros *Citrus* y *Poncirus* son susceptibles a psorosis, como así también sus híbridos, muy utilizados como portainjertos. Las especies

más susceptibles son la naranja dulce (*Citrus sinensis*), el limón rugoso (*Citrus jambhiri*), la mandarina (*Citrus reticulata*), y el pomelo (*Citrus paradisi*); mientras que otras especies como el naranjo agrio (*Citrus aurantium*), el limón (*Citrus limon*) y la toronja (*Citrus grandis*) pueden presentar síntomas, pero menos intensos (Gómez, 2019). Por fuera de los cítricos, el rango de hospedantes del virus es algo limitado y presenta características diferentes dependiendo de la planta en la que se inocule. La Figura 3 muestra hojas de *Chenopodium quinoa* (*C. quinoa*), con lesiones locales en forma de anillos cloróticos que aparecen entre los 4 a 7 días post-inoculación (dpi), y luego se tornan necróticos. *Gomphrena globosa* (*G. globosa*), otro hospedante muy utilizado, entre 10 a 15 dpi da lesiones cloróticas y necróticas en la zona de inoculación (infección local), y a los 21 dpi, el mismo tipo de lesiones en las hojas superiores (infección sistémica) (Milne *et al.*, 2003; Roistacher, 1993). Otras especies modelo han sido descritas como hospedantes del agente causal de psorosis, siendo una de ellas *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*) donde produce una infección asintomática, y sólo en las hojas inoculadas (Timmer *et al.*, 1978, Reyes *et al.*, 2009); por su parte, *Nicotiana occidentalis* presenta lesiones sistémicas, causando manchas cloróticas en las hojas rodeadas de un halo violáceo, que finalmente termina matando las hojas (Robles Luna, comunicación personal).

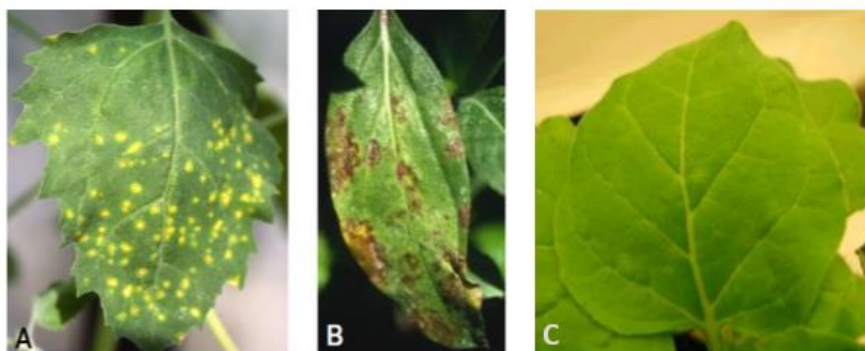


Figura 3: Síntomas locales en hospedantes herbáceos experimentales. Manchas cloróticas y necróticas en hojas de **A.** *C. quinoa*, donde produce infección local. **B.** *G. globosa*, se logra la infección sistémica en este hospedante. **C.** *N. benthamiana* infección asintomática en la hoja inoculada.

III. II. El virus de la psorosis de los cítricos (CPsV)

Si bien se tenían sospechas acerca de su naturaleza viral, tuvieron que pasar cerca de 100 años para poder identificar el agente causal de la psorosis de los

cítricos, cuyo nombre es citrus psorosis virus (CPsV). En 1988, Derrick y colaboradores lo describen como una partícula filamentosa y espiralada haciendo uso de la microscopía electrónica (Derrick *et al.*, 1988). Sin embargo, la verdadera morfología fue observada en 1994, por Robert G. Milne, quien encontró que los viriones de CPsV, eran partículas delgadas, filamentosas y circulares (García *et al.*, 1994).

Actualmente sabemos, que las partículas virales consisten de nucleocápsides no envueltas circulares de 3 nm de diámetro, las cuales adoptan varias conformaciones, desde muy enrollada hasta una forma sinuosa circular abierta. Las partículas poseen tamaños que van desde los 690 nm hasta los 2000 nm. Las mismas están cubiertas por una única proteína de la cápside (Derrick *et al.*, 1988; García *et al.*, 1991) y pueden colapsar *in vitro* para formar estructuras cerradas parcialmente ramificadas con alrededor de la mitad de la longitud del contorno circular y un diámetro de 9 nm (García *et al.*, 1994; Milne, 2000). Esta morfología le dio el nombre al género *Ophiovirus* derivado del griego "ophios", que significa serpiente (García *et al.*, 1994; Milne *et al.*, 2003). CPsV es miembro tipo la familia *Aspirividae* perteneciente al género *Ophiovirus*, uno de los pocos géneros de virus ARN negativo que infectan plantas (Kormelink *et al.*, 2011; García *et al.*, 2017).

III. II. A. Organización genómica de CPsV

En los últimos años se ha logrado secuenciar totalmente el genoma del virus, a partir de los aislamientos CPV-4 de Florida, Estados Unidos y P-121 de Valencia, España (Martín *et al.*, 2005); y se han obtenido secuencias parciales del genoma de otros aislamientos, como el aislamiento CPsV 90-1-1, de Concordia, Entre Ríos, Argentina (Martín *et al.*, 2006; Reyes *et al.*, 2009).

El virus es multipartito y su genoma segmentado en tres ARNs de cadena simple y polaridad negativa (Figura 4). El ARN 1 posee 8184 nucleótidos (nt) (Naum-Ongania *et al.*, 2003). En el extremo 5' contiene un ORF (del inglés *open reading frame*) que codifica para una proteína denominada 24K de 24 kDa (24K^{CPsV}), involucrada en la supresión del silenciamiento génico post-transcripcional (o PTGS, del inglés *post-transcriptional gene silencing*) y que afecta el silenciamiento mediado por microARNs (miARNs) (Reyes *et al.*, 2016; Robles Luna *et al.*, 2017). Tras una región intergénica de 109 nt, se encuentra el gen de la ARN polimerasa ARN dependiente (RDRp, del inglés *RNA-dependent RNA polymerase*) de 280 kDa. El ARN 2 de psorosis posee 1644 nt y contiene el gen que codifica para una aspartil proteasa de 54 kDa (54K^{CPsV}) (Sánchez de la Torre *et al.*, 2002), involucrada en el movimiento viral (Robles Luna *et al.*, 2013; Borniego *et al.* 2016; Robles Luna *et al.*, 2018) y en la supresión del PTGS (Robles Luna *et al.*, 2017). Por su parte, el ARN 3 de 1447 nt, contiene el gen de la proteína de cubierta (*coat protein*, CP), cuyo peso molecular es de 48 kDa (Peña *et al.*, 2012).

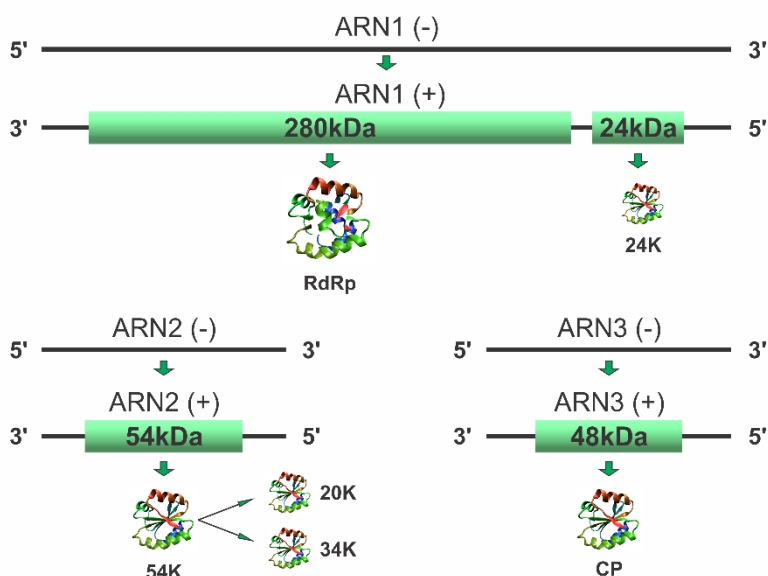


Figura 4: Organización genómica de CPsV. Se muestran los ARNs genómicos (polaridad negativa) y los ARNs complementarios que codifican para las proteínas virales (polaridad positiva). RDRp: ARN polimerasa ARN dependiente; 24K^{CPsV}: proteína involucrada en supresión del PTGS; 54K^{CPsV}: proteína involucrada en supresión del PTGS, capaz de escindirse y generar dos péptidos: 20K con actividad proteasa, y 34K movimiento viral; CP: proteína de cubierta.

III. II. B. Localización subcelular de las proteínas de CPsV

La naturaleza ARN simple hebra (ARNsh) de polaridad negativa de su genoma ha imposibilitado al día de hoy la utilización de metodologías como la genética reversa que permitan generar un sistema de clones infectivos y estudios funcionales sobre las proteínas codificadas por este virus utilizando métodos estándar de mutagénesis en el contexto de la infección. Pese a estas dificultades, en el grupo se ha avanzado mucho en el conocimiento respecto de la localización subcelular y funciones de las proteínas 24K^{CPsV}, CP^{CPsV} y 54K^{CPsV} (Peña *et al.*, 2012; Robles Luna *et al.*, 2013; Reyes *et al.*, 2016; Borniego *et al.* 2016; Robles Luna *et al.*, 2017; Robles Luna *et al.*, 2018).

La localización subcelular de las proteínas CP^{CPsV} y 54K^{CPsV} fue estudiada por fraccionamiento subcelular de extractos de *C. quinoa* infectada y mediante microscopia confocal de fluorescencia en *N. benthamiana*. Para ello, se utilizaron fusiones de dichas proteínas virales a la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés *green fluorescent protein*) expresadas transitoriamente en *N. benthamiana*. Se observó que la proteína CP^{CPsV} solo se ubica en el citoplasma (Peña *et al.*, 2012). Por su parte, la 54^{CPsV} se encontró en núcleo, citoplasma, pared celular, microtúbulos y plasmodesmos (Peña *et al.*, 2012; Robles Luna *et al.*, 2013). Estudios más recientes, han demostrado que esta proteína tiene la capacidad de auto-escindirse mediante un dominio aspartil proteasa generando dos segmentos, uno de 34 kDa (34K^{CPsV}) y otro de 20 kDa (20K^{CPsV}), y que el segmento 34K^{CPsV} sería el responsable del movimiento viral (Robles Luna *et al.*, 2018). Por su parte, se ha visto que la proteína 24K^{CPsV} se encuentra mayoritariamente en núcleo y nucleolo (Reyes *et al.*, 2016). A su vez, se ha encontrado que esta proteína se localiza en los cuerpos de Cajal (CBs, por *Cajal bodies*) y otros agregados subnucleares, microtúbulos y agregados citoplasmáticos en células epiteliales de *N. benthamiana* (Borniego, 2017).

Las localizaciones encontradas tanto para la 24K^{CPsV} como la 54K^{CPsV} son consistentes con las funciones de supresión del PTGS y de movimiento viral reportadas. Sobre la proteína CP solo se conoce su participación en la

encapsidación viral, aunque no se descarta otra posible función, debido a la multifunción de la mayoría de las proteínas virales.

IV. Silenciamiento génico mediado por ARN: regulación génica

El control de la expresión génica es un proceso vital para los organismos multicelulares. El silenciamiento génico mediado por ARN es un mecanismo de regulación de la expresión génica que se encuentra ampliamente distribuido en eucariotas. Permite el control de muchos de los procesos celulares, como así también sirve de respuesta frente a estreses bióticos o abióticos (Bologna y Voinnet, 2014; Zhang *et al.*, 2019). Este mecanismo puede operar mediante el control de la expresión a nivel transcripcional (o TGS, del inglés *transcriptional gene silencing*) por metilación de citosinas en el ADN o acción de histonas, inhibiendo la síntesis de ARN; o bien a nivel post-transcripcional (PTGS) degradando o evitando la traducción del ARN (Bologna y Voinnet, 2014; Zhang *et al.*, 2019). Las moléculas efectoras comprenden ARN pequeños (o sRNA, por *small RNA*) de 20-30 nt los cuales presentan homología parcial o completa con sus moléculas blanco (o *targets*).

En la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) estas vías se encuentran muy estudiadas. Actualmente, sabemos que existen distintos tipos de sRNA: los microARN (miARN) y los ARN de interferencia cortos (siRNA, del inglés *short interfering RNA*). A su vez, dentro de los siRNAs se han identificado un gran número de especies, los cuales se diferencian en su biogénesis, proteínas a las que se asocian y modos de acción (Bologna y Voinnet, 2014). A modo general, los sRNAs se generan a partir de ARN doble hebra (ARNdh) de mayor longitud, por acción de ribonucleasas clase III de tipo *DICER* (DCL, del inglés *Dicer-Like*) generando sRNAs doble cadena ~20-30 pares de bases (pb). Una de las hebras del sRNA se une a un complejo proteico denominado RISC (del inglés, *RNA-induced silencing complex*), el cual se encarga de llevar a cabo el silenciamiento génico. Entre los componentes principales de este complejo se encuentran las

proteínas Argonautas (AGO) (Ding y Voinnet, 2007; Incarbone y Dunoyer, 2013; Zhang *et al.*, 2019).

A pesar de las diferencias en el modo de generación, los mecanismos de silenciamiento génico mediado por sRNAs comparten cuatro pasos comunes y necesarios (i) el procesamiento de un ARNdh largo para liberar un dúplex de ARN, de un tamaño de 20-30 pb de longitud, (ii) la metilación de ambos extremos 3' del dúplex, (iii) la selección de una de las hebras del dúplex de ARN y su incorporación en el complejo efector que contiene una proteína de la familia AGO y, por último, (iv) el reconocimiento del ácido nucleico blanco por complementariedad de bases y su silenciamiento (Chapman y Carrington, 2007; Bologna y Voinnet, 2014).

V. Biogénesis de microARNs en plantas

Los miARNs son reguladores muy importantes de la expresión génica en plantas. Son sRNAs endógenos que poseen un tamaño de ~21 nt y controlan procesos vitales como el desarrollo, crecimiento, señalización hormonal y adaptación al estrés mediante la regulación de la expresión de muchos factores de transcripción y proteínas de respuesta a estrés (Manavella *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019). Los miARNs pueden controlar la expresión génica de maneras diferentes, inhibiendo la traducción o bien provocando la degradación los transcritos de ARN en la célula. En los últimos años, se han reportado muchas evidencias que demuestran que estas moléculas no solo responden a señales internas sino también a estímulos externos de la planta. A su vez, la maquinaria de procesamiento de los miARNs también responde a este tipo de señales, lo que demuestra que cualquier alteración en la planta puede desencadenar cambios masivos en numerosas familias de miARNs (Manavella *et al.*, 2019).

A continuación, se detallarán los pasos del mecanismo por el cual las células vegetales generan los miARNs y forman, finalmente, el complejo RISC del silenciamiento.

V. I. Transcripción de genes MIR

Tanto en plantas como en animales, los miARNs son generados a partir de *loci* endógenos. Mientras que muchos miARNs de animales provienen de intrones o regiones no traducidas de ARN mensajero (ARNm) codificantes (Carthew y Sontheimer, 2009; Kim *et al.*, 2009), en plantas los genes que codifican para miARNs (genes MIR) son, en su mayoría, unidades transcripcionales independientes (Zhang *et al.*, 2015; Stepień *et al.*, 2017).

Los genes MIR son transcritos por la ARN Polimerasa II (ARNpol II) en el núcleo, generando un transcripto primario denominado pri-miARN (Figura 5). Este pri-miARN, al igual que los ARNm, sufre modificaciones post-transcripcionales como: poliadenilación, agregado del 5'CAP y, en algunos casos, se producen eventos de *splicing*; este último proceso suele ocurrir principalmente hacia la región 3' de los pri-miARN (Xie *et al.*, 2005; Zhao y Srivastava *et al.*, 2007; Schwab *et al.*, 2013). Se han reportado algunos pocos ejemplos en planta donde el precursor del miARN se encuentra en intrones de genes que codifican para proteínas, aunque no es el caso de miARNs conservados evolutivamente (Manavella *et al.*, 2019).

La actividad de la ARNpol II en la transcripción de los genes MIR está regulada por un gran número de proteínas (Bologna y Voinnet, 2014; Zhang *et al.*, 2015; Achkar *et al.*, 2016; Manavella *et al.*, 2019). En la etapa inicial de la transcripción, *Negative On TATA Less 2* (NOT2), *Cell Division Cycle 5* (CDC5) y el complejo *Mediator* son necesarios para el reclutamiento de la ARNpol II en estos *loci* (Figura 5. A; Zhang *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2015). Después del reclutamiento, los cambios en la fosforilación del dominio C-terminal de ARNpol II, mediado por *Cyclin-dependent Kinases* (CDK) y *C-terminal domain phosphatase-like 1 y 2* (CPLs), regulan el inicio de la transcripción (Zhang *et al.*, 2015; Achkar *et al.*, 2016; Stepień *et al.*, 2017). Por su parte, el complejo *Elongator* es un regulador general de la expresión de miARNs. Es requerido para que la ARNpol II ocupe el *loci* del miARN y además tiene la capacidad de interactuar con DCL1 y probablemente con *Serrate* (SE), facilitando el anclaje del complejo procesador durante la elongación de la transcripción (Figura 5. B; Fang *et al.*, 2015a). Se ha

demostrado que las subunidades *CAP-binding protein 80* y *20* (CBP80 y CBP20, respectivamente) del complejo de unión al CAP (o CBC, por *nuclear cap-binding complex*) se asocian a la proteína SE (Laubinger *et al.*, 2008), mientras que CBP20 también lo hace con el co-activador transcripcional NOT2 (Figura 5. B y C; Wang *et al.*, 2013). Los roles serían la estabilización de la transcripción, la asistencia con el ensamblaje del spliceosoma y el reclutamiento de los componentes del procesamiento de pri-miARN.

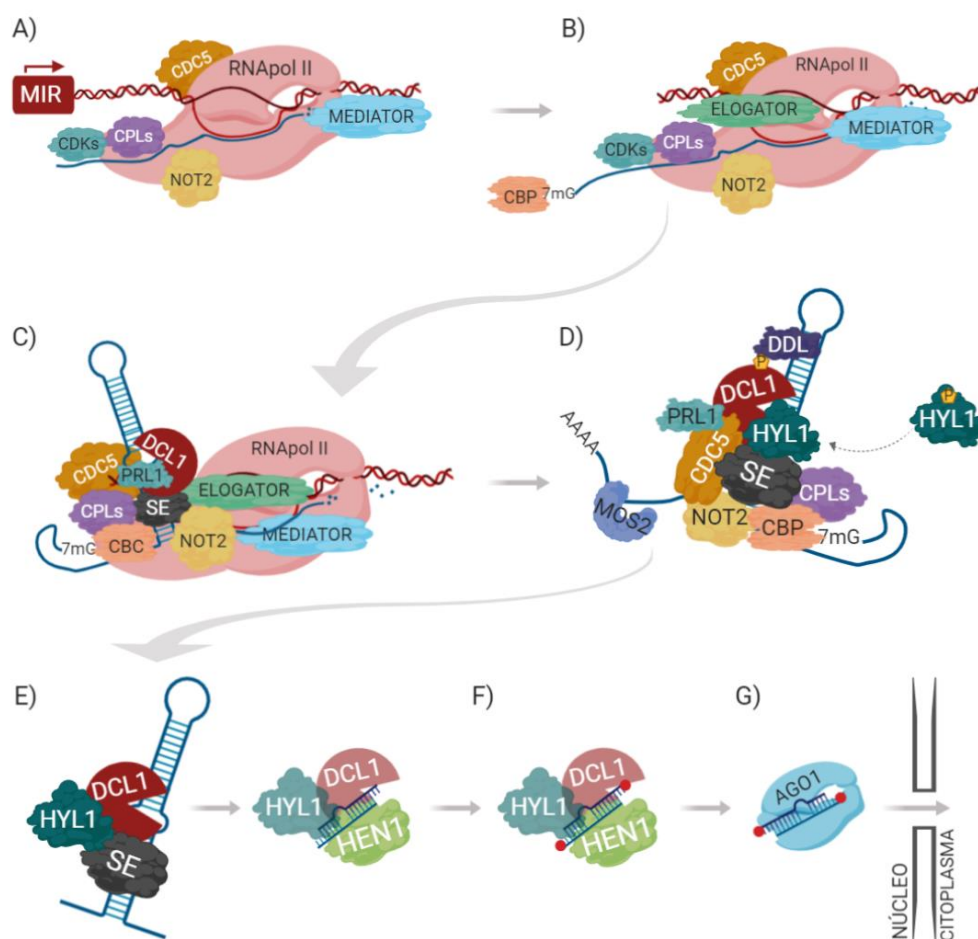


Figura 5: Ensamblaje co-transcripcional del complejo de procesamiento de miARNs. Esquema representativo de la secuencia sugerida del reclutamiento y ensamblaje de la maquinaria de procesamiento de miARN. **(A)** En la etapa inicial de la transcripción del gen MIR, NOT2, CDC5 y *Mediator* son necesarios para el reclutamiento de ARN polimerasa II (RNAPol II) en estos *loci*. Los cambios en la fosforilación del C-terminal de RNAPol II, mediado por CDK y CPL, regulan el inicio de la transcripción. **(B)** El complejo *Elongator* interactúa con RNAPol II, mientras que el 5'CAP del pri-miARN naciente está unido por el complejo de unión nuclear CAP (CBC; CBP80/20). **(C)** *Elongator* actúa como un andamio que recluta DCL1 al pri-miARN naciente. Las interacciones de SE con CBC, CPL, NOT2, DCL1 y CDC5 hacen que sea difícil predecir cuándo y a través de qué interacción es reclutada. **(D)** El pre-miARN se estabiliza mediante DDL tras la interacción dual con DCL1 y el precursor. La desfosforilación de HYL1, por CPL, induce su actividad y reclutamiento al complejo. **(E)** DCL1 comienza a procesar el pre-miARN desde la base o el bucle dependiendo de la estructura y longitud de cada pre-miARN. En este punto se muestra una versión simplificada del complejo de procesamiento. **(E)** Una vez que se produce el dúplex miARN maduro, HEN1 interactúa con DCL1 y HYL1 para desplazar SE del complejo. **(F)** Los extremos 3' de ambas cadenas de miARN/miARN* son metilados por HEN1. **(G)** AGO1 forma el complejo AGO1:miARN en el núcleo y se exporta al citoplasma mediante un mecanismo mediado por CRM1(EXPO1)-NES para formar el complejo RISC. Adaptado de Achkar *et al.*, 2016 y Bologna *et al.*, 2018.

V. II. Procesamiento de pri-miARNs

Una vez generados, los pri-miARN son capaces de plegarse y formar estructuras con apareamiento imperfecto de tipo tallo-bucle (Figura 5. D; Jones-Rhoades *et*

al., 2006). El transcripto primario es procesado por la proteína DCL1 en el núcleo generando lo que se conoce como precursor de miARN (pre-miARN) (Park *et al.*, 2002; Reinhart *et al.*, 2002). Para poder procesar el pre-miARN de manera correcta, DCL1 se asocia con proteínas accesorias, como la proteína *Hyponastic leaves-1* (HYL1) de unión a ARNdh y la proteína *zinc-finger domain Serrate* (SE), que modulan la eficiencia y precisión de los cortes de DCL1 (Vázquez *et al.*, 2004a; Laubinger *et al.*, 2008). Si bien el complejo de procesamiento está compuesto por un número mayor de proteínas (Figura 5. D), DCL1, HYL1 y SE constituyen la parte fundamental del mismo. Dentro de este complejo, DCL1 es capaz de reconocer los determinantes estructurales presentes en los precursores, llevar a cabo un determinado número de cortes y liberar, finalmente, el dúplex de miARN/miARN* que contendrá el miARN maduro funcional (Figura 5. E; Park *et al.*, 2002; Kurihara y Watanabe, 2004; Moro *et al.*, 2018). Se ha postulado que la biogénesis ocurre en agregados nucleares especializados denominados cuerpos D (o *D-bodies* por *dicing bodies*) (Fang y Spector, 2007). Sin embargo, no hay pruebas suficientes de que el procesamiento tenga lugar exclusivamente en estas estructuras. Todos los estudios que afrontan esta cuestión se han realizado en extractos nucleares y, por lo tanto, no abordan la ubicación del procesamiento. Los ensayos *in vitro* sugieren que los cuerpos D no son esenciales para el procesamiento de pre-miARN (Achkar *et al.*, 2016).

A diferencia de lo que ocurre en animales, donde los pre-miARN poseen una estructura de tallo/bucle de ~65 pb (Figura 6. A; Ha y Kim, 2014), los pre-miARNs de plantas presentan tamaños que pueden variar desde los 50 nt hasta 900 nt (Zhang *et al.*, 2015). Esto se traduce en un amplio abanico de estructuras diferentes donde el único tamaño conservado entre los precursores, es el del dúplex miARN/miARN* de ~21pb (Figura 6. B; Bologna *et al.*, 2009; Cuperus *et al.*, 2011). La evidencia experimental indica que es la estructura secundaria por sobre la secuencia primaria del precursor la determinante del correcto procesamiento del mismo (Song *et al.*, 2010; Bologna *et al.*, 2013).

En plantas existen cuatro mecanismos principales por los cuales la maquinaria de procesamiento puede reconocer al pre-miARN y cortarlo, lo cual podría explicar la heterogeneidad de estructuras de los precursores (Bologna *et al.*,

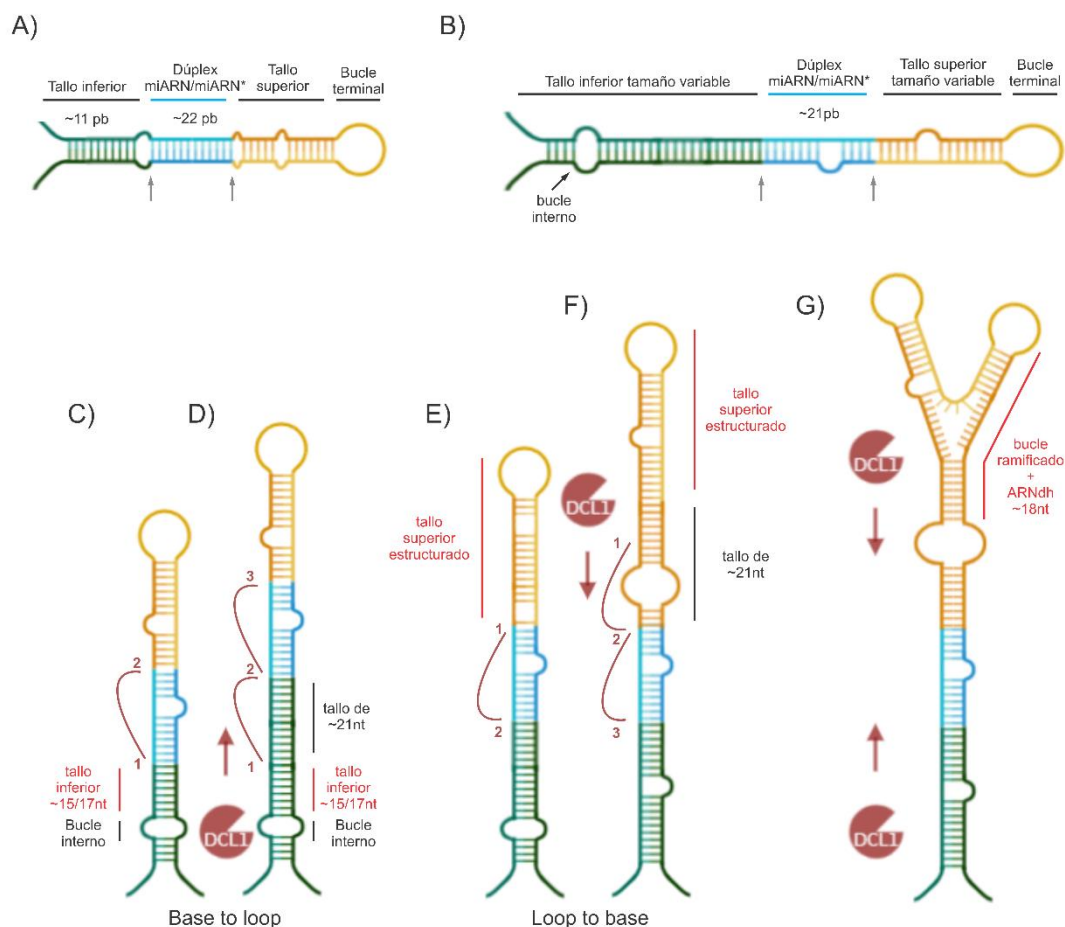


Figura 6: Estructuras secundarias de precursores y mecanismos de procesamiento de pre-miARNs en plantas. **A)** Esquema de un pre-miARN de animales. El mismo consiste en un tallo imperfecto posee de ~65 nt, donde el dúplex miARN/miARN* posee una longitud de ~22pb y el tallo inferior ~11pb. El tallo superior y el bucle terminal son pequeños. **B)** Esquema de un pre-miARN de plantas con tamaño variable entre ~50-900 nt. El mismo consiste en tallo inferior de longitud variable que puede contener bucles internos, un dúplex de miARN/miARN* de ~21pb, y un tallo superior y loop terminal de longitud variables. **C)** Esquema de un precursor procesado en sentido *base to loop* corto. **D)** Esquema de un precursor procesado desde la base al bucle de forma secuencial. **E)** Biogénesis de un pre-miARN por *loop to base* en dos pasos. **F)** Esquema de un pre-miARN procesado desde el bucle hacia la base por mecanismo *loop to base* secuencial. **G)** pre-miARN ramificado; las evidencias experimentales indican que pueden procesarse en ambas direcciones, aunque la presencia de un tallo de ARNdh de ~18nt seguido del bucle ramificado daría pie a un procesamiento correcto.

En todos los casos: en amarillo se indican las regiones por encima del dúplex miARN/miARN* (celestes) que contienen a los bucles terminales. La base o tallo inferior, se indica en verde.

2013b; Moro *et al.*, 2018). Un grupo de precursores de miARNs presenta un tallo inferior de ARNdh de ~15-17 pb seguido de un bucle interno por debajo del dúplex del miARN/miARN*, el cual es reconocido por el complejo de DCL1 y especifica la posición del primer corte (Figura 6. C) (Mateos *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2013; Bologna *et al.*, 2013b). Luego DCL1 realiza un segundo corte a ~21 nt del primero, y libera el dúplex del miARN/miARN*. Este mecanismo es denominado *base to loop* (por su dirección, de tallo a bucle) y

tiene semejanza con el mecanismo de procesamiento descrito para animales (Ha y Kim, 2014; Kwon *et al.*, 2016). Este determinante de ~15-17 pb está presente también en un segundo grupo de precursores, los cuales presentan un tallo inferior más largo, con una región de ~21 nt entre el determinante estructural y el miARN/miARN* (Figura 6. D). Estos precursores son también procesados desde la base al bucle, pero requieren de tres o más cortes consecutivos de DCL1 para liberar el miARN maduro en lugar de dos. Dicho procesamiento se ha denominado *base to loop* secuencial (Kurihara y Watanabe, 2004; Bologna *et al.*, 2013b).

Existe otro grupo de precursores de plantas cuya biogénesis se inicia con un primer corte de DCL1 por debajo del bucle terminal y luego continúa en dirección al tallo del precursor (Figura 6. E). En este caso, el mecanismo se denomina *loop to base* (Addo-Quaye *et al.*, 2009; Bologna *et al.*, 2009; Bologna *et al.*, 2013b). El determinante estructural de estos precursores comprende una región estructurada de ARNdh de ~42 nt por encima del dúplex miARN/miARN* con un pequeño bucle terminal (Bologna *et al.*, 2013b). Como en el caso del sentido *base to loop*, existen pre-miARNs que poseen tallos superiores más largos que los nombrados anteriormente, por lo que requieren de un mayor número de cortes por parte de DCL1. A este mecanismo se lo denomina *loop to base* secuencial (Figura 6. F) (Addo-Quaye *et al.*, 2009; Bologna *et al.*, 2009; Bologna *et al.*, 2013b).

Existe además un grupo de pre-miARNs con determinantes estructurales diferentes, caracterizados por poseer un *loop* terminal ramificado (Figura 6. G). En estos casos, se ha visto que la maquinaria de biogénesis es capaz de reconocer al pre-miARN desde ambos extremos y procesarlos en ambos sentidos (Zhu *et al.*, 2013). Esta característica se ha relacionado con la generación de cortes improductivos y una vía que conduce a la destrucción de los precursores (Zhu *et al.*, 2013). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que el miR157c de *A. thaliana*, posee un bucle ramificado y su reconocimiento puede conducir a la generación miARNs maduros funcionales, aunque de manera menos eficiente que otros miembros de la familia que presentan un bucle terminal no ramificado (Moro *et al.*, 2018). En dicho trabajo, se sugiere que la

presencia de un segmento de 18 nt de ARNdh por debajo del bucle terminal ramificado es el determinante estructural necesario para el reconocimiento y corte por DCL1 (Moro *et al.*, 2018).

VI. Formación del complejo RISC y moléculas efectoras

Una vez que el dúplex miARN/miARN* es liberado, éste contiene dos nucleótidos simple hebra protruyentes en los extremos 3' los cuales son metilados por la metiltransferasa *Hua Enhancer 1* (HEN1) previniendo su degradación (Figura 5. F; Boutet *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2005). El dúplex metilado se carga en una proteína AGO, generalmente AGO1, con la ayuda de la chaperona *Heat-Shock-Protein-90* (HSP90) para formar el complejo RISC del silenciamiento (Figura 5. G; Iki *et al.*, 2010; Bologna *et al.*, 2018). Allí, AGO1 retiene una de las cadenas y libera la otra, comúnmente se libera el miARN*. Sin embargo, en determinadas situaciones o tejidos, el miARN* también se puede retener y cumplir funciones reguladoras (Zhang *et al.*, 2011; Manavella *et al.*, 2013). Si bien no se conoce en detalle cómo ocurre esta parte del proceso, se sabe que la estructura del dúplex miARN/miARN* y la identidad de la base 5' (Fang y Qi, 2016), así como la presencia de HYL1 (Eamens *et al.*, 2009), son importantes para que esto ocurra.

Hasta hace un tiempo se pensaba que el cargado del miARN en el complejo RISC se producía en el citoplasma, pero estudios recientes, han propuesto que el cargado del miARN en AGO1 se produce en el núcleo y, una vez que esto ocurre, se genera un cambio conformacional en AGO1 que expone una señal de exportación nuclear (o NES, por *nuclear export signal*) en su extremo N-terminal que la re-dirige al citoplasma (Bologna *et al.*, 2018). De este modo, el complejo AGO1-miRNA se formaría en el núcleo, y luego se movería al citoplasma mediante un mecanismo dependiente de CRM1/*Exportin1* (EXPO1)-NES para ejercer su función (Bologna *et al.*, 2018).

El paso final de la regulación mediada por miARNs se produce al reconocer su gen *target* mediante complementariedad de bases dentro del complejo RISC. Si

bien la regulación de la mayoría de los *targets* se ejerce mediante el corte por parte de AGO1, un grupo de ellos sufre regulación traduccional (Bologna y Voinnet, 2014). Los miARNs de plantas actúan sobre conjuntos reducidos de *targets* los cuales codifican factores de transcripción, proteínas de respuesta a estrés, o factores que controlan la identidad celular, el desarrollo y el crecimiento (Bologna y Voinnet, 2014).

VII. Proteínas involucradas en la biogénesis y función de miARNs

Como se mencionó anteriormente, la biogénesis de miARNs, es un proceso complejo que involucra muchas proteínas (Bologna y Voinnet, 2014; Zhang *et al.*, 2015). Se ha determinado que dichas proteínas son modulares, ya que contienen diferentes dominios con funciones específicas. A continuación, se describen los dominios de las principales proteínas implicadas en la biogénesis y función de los miARNs en plantas: DCL1, HYL1, SE y AGO1.

VII. I. Dicer-like 1, DCL1

Arabidopsis thaliana es uno de los sistemas más estudiados para entender la vía de regulación mediada por miARNs. En esta planta modelo se han identificado 4 proteínas *Dicer like* (nombradas como DCL1-4) (Bologna y Voinnet, 2014), mientras que en *C. sinensis* recientemente se han identificado 5 (Sabbione *et al.*, 2019). Estas enzimas son RNasas tipo III específicas de ARNdh, cuyos productos de digestión son fragmentos de ARNdh con un grupo fosfato 5' y un hidroxilo terminal 3' en cada hebra. Se sabe que DCL1/DCL4 generan productos de 21 nt de largo, mientras que DCL2 y DCL3 generan productos de 22 nt y 24 nt respectivamente. DCL1 está involucrada en la biogénesis de miARN y nat-siARN (Cuperus *et al.*, 2011; Rogers y Chen, 2013). DCL2 en la formación nat-siARN y de siARN exógenos en respuesta a un transgén o defensa antiviral (Jauvion *et al.*, 2012). DCL3 está implicada en el TGS mediante modificación de la cromatina, además de generar siARN en ciertas ocasiones (Pontes *et al.*, 2006). DCL4 es la responsable de la biogénesis de tasiARNs, TGS y también

participa en la defensa antiviral (Henderson *et al.*, 2006; Bologna y Voinnet, 2014). Sin embargo, estudios con doble, triple y cuádruples mutantes de estas proteínas han mostrado que pueden actuar de manera redundante y compensar la ausencia de alguna de ellas en la producción de ciertos ARN pequeños, en especial en la respuesta a la infección por virus o actuar en paralelo sobre ciertos sustratos (Gascioli *et al.*, 2005; Blevins *et al.*, 2006; Henderson *et al.*, 2006; Moissiard y Voinnet, 2006).

En cuanto a su composición estructural, se ha demostrado que las DCLs de *A. thaliana* poseen 5 tipos de dominios: un dominio helicasa (DExD/Helicasa) hacia su N-terminal, un pequeño dominio de interacción proteína–proteína (DUF283), un dominio PAZ (del inglés, “*Piwi/Argonaute/Zwille*”), dos dominios RNasa III en tándem, y al menos un dominio dsRBD (del inglés, *dsRNA binding domain*) en el extremo C-terminal (Figura 7; Bologna y Voinnet, 2014). Para el caso de DCL1, DCL3 y DCL4, se observó la existencia de un segundo dominio dsRBD en el C-terminal (Bologna y Voinnet, 2014). Se ha propuesto que el dsRBD2 no solo interacciona con el ARNdh, sino que, además promueve la localización nuclear de estas proteínas (Burdisso *et al.*, 2012; Carbonell *et al.*, 2012). Mutaciones en el dominio helicasa, RNasa III o en los dsRBDs de DCL1 reducen la acumulación de miARNs maduros *in vivo* (Kurihara y Watanabe, 2004; Willmann y Poethig, 2011).

Se ha informado que el dominio DExD/Helicasa facilita el reconocimiento del pre-miARN y, a su vez, puede presentar funciones de interacción proteína-proteína que modulan la actividad de *Dicer* hasta el ensamble del complejo de procesamiento (Ma *et al.*, 2012). Ensayos con un mutante de DCL1 cuyo dominio helicasa está inactivo, demostraron que el mutante era incapaz de acumular miARNs maduros, aunque presentaba una alta eficiencia y precisión del primer corte (Kurihara *et al.*, 2006). Esto sugiere que el dominio no está implicado en el primer corte llevado a cabo sobre el precursor, pero sí en el resto del proceso (Bologna y Voinnet, 2014). Además, DExD/Helicasa es necesario para el correcto procesamiento *in vivo* de al menos algunos pri-miARNs y de la actividad de la enzima dependiente de ATP *in vitro* (Liu *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2013).

Estudios del dominio DUF283 de DCL4 mostraron que el mismo presenta una estructura similar a un dsRBD, pero es incapaz de unirse a ARNdh. Por el contrario, permite la interacción con la proteína accesoria de unión a ARN DRB4 (Qin *et al.*, 2010). En dicho trabajo, se sugiere que el dominio DUF283 de DCL1 interaccionaría específicamente con HYL1.

El dominio PAZ tiene la capacidad de unirse a los extremos 3' de ARNs simple cadena. En *A. thaliana* DCL2, DCL3 y DCL4 procesan sustratos de ARNdh largos y casi perfectos generando poblaciones de siARN de 22, 24 y 21 nt, respectivamente (Qi *et al.*, 2005). Estas especificidades de tamaño probablemente se expliquen por la distancia que separa el dominio PAZ y los dominios catalíticos de cada proteína (Bologna y Voinnet, 2014).

El mecanismo de acción propuesto para estas enzimas consiste en la dimerización intramolecular de los dominios RNasa III para formar un único centro catalítico (Zhang *et al.*, 2004). En este centro catalítico cada dominio RNasa corta una de las hebras del ARNdh. La distancia entre dichos dominios sería la responsable de que se generen extremos 3' con dos nucleótidos protruyentes de diferencia.

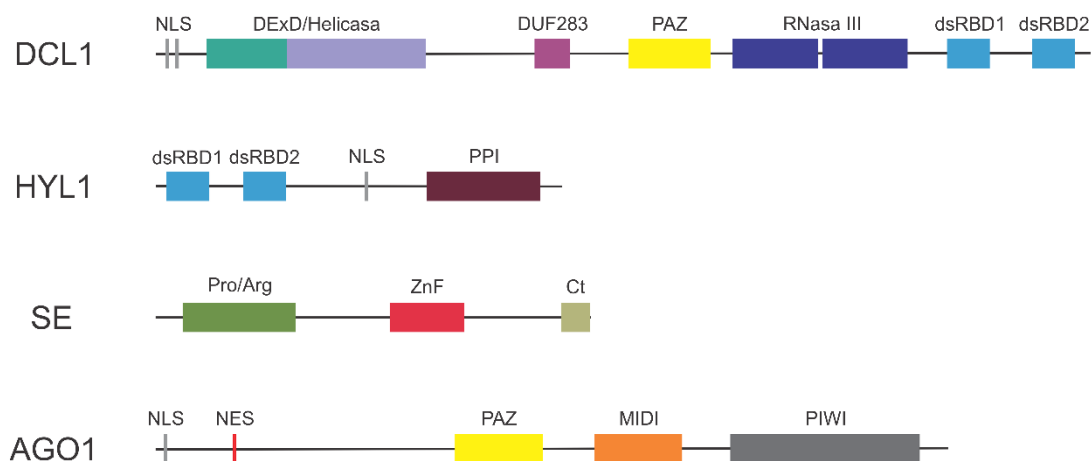


Figura 7: Representación esquemática de los dominios y señales presentes en las proteínas involucradas en la biogénesis y función de los miARNs. Los esquemas son ilustrativos y no representan los tamaños reales de las proteínas. Modificado de Bologna y Voinnet, 2014.

VII. II. Hyponastic Leaves 1, HYL1

En *A. thaliana*, existen al menos 5 DRBs (del inglés, *double-stranded RNA binding proteins*), denominadas DRB1-5 (Hiraguri *et al.*, 2005). DRB1, mejor conocida como *Hyponastic Leaves 1* (HYL1), actúa como cofactor de DCL1 y permite el procesamiento eficiente y preciso del pre-miARN (Kurihara *et al.*, 2006; Manavella *et al.*, 2012a; Yang *et al.*, 2014). Si bien se creía que las demás DRBs no estaban implicadas en la generación de miARNs, DRB2 ha demostrado ser capaz de suplir a HYL1, permitiendo la generación de un grupo específico de miARNs (Eamens *et al.*, 2012). Además, DRB2 reprime la expresión de HYL1 e induce la inhibición de la traducción de genes específicos mediada por miARNs (Reis *et al.*, 2015). A pesar de no afectar la producción de miARNs, DRB3 y DRB5 cooperan con DRB2 para silenciar genes (Eamens *et al.*, 2012).

Respecto a su conformación, se ha demostrado que HYL1 contiene dos motivos dsRBD en tándem sobre el extremo N-terminal y, cercano a ellos, posee una señal de localización nuclear (NLS, del inglés *nuclear localization signal*). Finalmente, hacia su extremo C-terminal, posee un dominio putativo de interacción proteína-proteína (PPI, del inglés, *putative protein-protein interaction*) (Figura 7; Wu *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2014). Para que se produzca la interacción con DCL1 y permitir el correcto procesamiento de miARNs, es necesaria la homodimerización de HYL1 (Yang *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2014). Bajo estas circunstancias, el motivo RBD1 sería responsable de la interacción con el ARNdh y el motivo RBD2 estaría involucrado en las interacciones proteína-proteína (Yang *et al.*, 2014). Ensayos con mutantes indican que el extremo C-terminal sería dispensable para el procesamiento de los miARNs, mientras que la región N-terminal conteniendo los dos dsRBD, es suficiente para rescatar el fenotipo de *hyl1* (Wu *et al.*, 2007). Mediante ensayos de doble híbrido se ha demostrado que HYL1 interactúa además con SE, y que el motivo RBD2 están involucrados en dicha interacción (Lobbess *et al.*, 2006). Por otra parte, HYL1 también afecta el *splicing* de algunos pri-miARNs y la selección de cadenas de dúplex miARN/miARN* al momento de ser cargados en AGO1 (Szarzynska *et al.*, 2009; Manavella *et al.*, 2012a; Ben Chaabane *et al.*, 2013).

Se han descubierto diferentes mecanismos reguladores que afectan la actividad, la estabilidad y la localización nuclear de HYL1. HYL1 necesita tener su dominio RBD2 defosforilado para poder llevar a cabo su función. Las proteínas CPLs y el complejo *Phosphatase 4 (PP4)/Suppressor of MEK 1 (SMEK1)* defosforilan HYL1 y facilitan el procesamiento preciso del pre-miARN y la selección de cadenas durante el cargado en AGO1 (Manavella *et al.*, 2012a). Esta defosforilación puede ser contrarrestada por las proteínas quinasas *Mitogen-activated protein kinase 3 (MPK3)* y SnRK2 (Raghuram *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2017). La forma fosforilada de HYL1 impide su degradación, aunque también su interacción con SE (Achkar *et al.*, 2018). Por otra parte, la estabilidad de la proteína HYL1 se regula mediante la *E3 ubiquitin ligase constitutive photo-morphogenic 1 (COP1)* a través de señales de captación de la luz. En condiciones de luz, COP1 se desplaza al citoplasma y suprime la escisión por proteasas de HYL1. En la oscuridad, COP1 ingresa al núcleo, desreprime a las proteasas y permite la degradación de HYL1 en el citoplasma (Cho *et al.*, 2014; Achkar *et al.*, 2018). Esto genera que en condiciones de oscuridad se vea disminuida la acumulación de un grupo particular de ~35 miARNs entre los que se encuentran el miR156, miR158, miR159, miR162, miR167, miR168, miR170, miR171, miR172, miR319, miR390, miR391, miR393 y miR403 (Achkar *et al.*, 2018).

VII. III. Serrate, SE

Esta proteína fue descrita primeramente como una proteína involucrada en el desarrollo del tallo (Prigge y Wagner, 2001). Posteriormente, estudios de mutantes en se mostraron niveles reducidos de miARNs maduros, aumento de los niveles de pri-miARNs sin procesar y defectos en el *splicing* de ARNm. Debido a ello, se la relacionó con la biogénesis miARNs (Grigg *et al.*, 2005; Lobbes *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006; Laubinger *et al.*, 2008). Es una proteína que está conservada tanto en plantas como en animales (Iwata *et al.*, 2013).

Estructuralmente, el único dominio encontrado por homología de proteínas sobre la secuencia de SE consiste en un dominio dedos de zinc del tipo C₂H₂ (ZnF, *zinc*

finger domain) (Iwata *et al.*, 2013). Sumado a ello, un alineamiento aminoacídico entre homólogos de distintas especies reveló la existencia de una región de baja complejidad hacia el N-terminal que contiene 30 residuos de prolina y 30 de arginina (Pro/Arg o P/R). Además, se encontró una región conservada hacia el C-terminal de ~25 aminoácidos no caracterizada (Figura 7; Iwata *et al.*, 2013).

Actualmente se conoce que SE interacciona tanto con DCL1 como con HYL1. Mediante experimentos *in vitro* se demostró que SE interactúa también con el ARNdh y lo hace antes de unirse a DCL1. Esto viene dado por el dominio P/R que, a su vez, es necesario para que junto al dominio ZnF se produzca la interacción de SE con DCL1 (Dong *et al.*, 2008; Iwata *et al.*, 2013). La región encargada de guiar correctamente los cortes dados por DCL1 estaría dada solamente por el dominio ZnF (Iwata *et al.*, 2013). En ese mismo trabajo, se sugiere que la interacción entre SE, DCL1 y el ARN funciona como un potencial punto de regulación del procesamiento de pri-miARNs.

Por otra parte, se postuló que SE actúa como un mediador común entre CBC (el cual se encuentra unido al cap 5' de los ARNm y de los pri-miARN), los complejos de procesamiento del ARN y, a su vez, con la maquinaria de corte y empalme (Laubinger *et al.*, 2008). Estas interacciones podrían estar dadas por el dominio C-terminal de la proteína (Iwata *et al.*, 2013).

Un estudio reciente demostró una actividad no canónica de los factores de remodelación de la cromatina (CHRs, del inglés *chromatin remodelling factors*) en la regulación de la expresión de miARNs a nivel post-transcripcional (Wang *et al.*, 2018). Más precisamente, en dicho trabajo encontraron que CHR2 –la subunidad ATPasa del complejo SWI/SNF remodelador de la cromatina – es capaz de regular negativamente la acumulación de un gran número de miARNs como, por ejemplo, el miR168. Esto se logra debido a una interacción entre CHR2 y el complejo pri-miARN-SE. Dicha interacción produce cambios en la estructura secundaria del pri-miARN que impiden su procesamiento por DCL1. A su vez, CHR2 actúa antes de que HYL1 se incorpore al complejo pri-miARN-SE, ya que HYL1 posee mayor afinidad por el pri-miARN y una vez unido, es

procesado. Por lo tanto, se ha propuesto que CHR2 funciona como una nueva etapa de regulación para la acumulación de miARNs vía SE.

VII. IV. Argonauta 1, AGO1

Las proteínas *Argonautas*, son el componente central de los complejos RISC a través del cual los miARNs llevan a cabo su función. En *A. thaliana* se han encontrado 10 proteínas de este tipo (nombradas como AGO1-10) (Vaucheret *et al.*, 2008; Mallory y Vaucheret, 2010). Las proteínas AGOs están constituidas por un dominio N-terminal variable y por tres dominios conservados PAZ, MID y PIWI respectivamente (Figura 7). Juntos, estos tres dominios posicionan correctamente el sRNA en relación a la secuencia blanco. El dominio MID reconoce el extremo 5' del sRNA, mientras que el dominio PAZ se ancla al extremo 3' (Frank *et al.*, 2012). El dominio N-terminal, se propuso que participa en el desenrollamiento del dúplex durante la formación del RISC (Kwak y Tomari, 2012). La actividad catalítica reside en el dominio PIWI, el cual tiene un plegamiento similar a las ribonucleasas tipo H (Wei *et al.*, 2012a). Sin embargo, el corte del ARNm blanco ha sido demostrado solamente para AGO1, AGO2, AGO7 y AGO10 las cuales participan del PTGS, y AGO4 implicada en el TGS (Zhu *et al.*, 2011; Carbonell *et al.*, 2012; Manavella *et al.*, 2012b). Se ha observado, además, que las AGOs tienen preferencia tanto por el tamaño como por identidad del nucleótido presente en el extremo 5' del sRNA (Zhang *et al.*, 2019).

Si bien AGO1 es el actor principal en la regulación mediada por miARNs, estudios en *A. thaliana* realizados a partir de inmunoprecipitaciones de AGOs mostraron que otros miembros de la familia pueden cargar miARNs en los complejos RISC y que lo hacen con preferencia tanto por el nucleótido 5' como por el largo de sRNA (Mi *et al.*, 2008; Montgomery *et al.*, 2008a; Zhu *et al.*, 2011). AGO1, AGO2, AGO5, AGO7 y AGO10 unen preferentemente moléculas de 21-22 nt, mientras que AGO4, AGO6 y AGO9 están más relacionadas con sRNAs de 24 nt (Carbonell y Carrington, 2015; Zhang *et al.*, 2019). En lo que respecta a identidad del nucleótido 5' AGO1, -2 y -5 se unen preferentemente a sRNAs que presenten un nucleótido 5'U, A o C respectivamente (Mi *et al.*, 2008), mientras

que, AGO4, AGO6 y AGO9 se asocian principalmente con aquellos que comienzan con 5'A. La mayoría de los miARNs presentan una U en el extremo 5', lo que ayudaría a la selección del ARN pequeño por AGO1, la principal efectora de la actividad de los miARNs (Vaucheret *et al.*, 2004; Mi *et al.*, 2008; Voinnet, 2009). Existen requerimientos especiales que pueden actuar independientemente de la identidad del nucleótido 5' para determinar la carga en una AGO particular, los cuales incluyen *mismatches* en posiciones claves o interacciones con otras proteínas. Por ejemplo, los miembros de la familia miR165/166 se asocian con AGO10 a pesar de presentar un extremo 5'U (Zhu *et al.*, 2011), mientras que el miR390 se asocia específicamente con AGO7 en lugar de AGO2, como se esperaría teniendo en cuenta que comienza con 5'A (Montgomery *et al.*, 2008a).

AGO1, además de actuar en las vías efectoras de miARNs, se la ha visto implicada en la remodelación de la cromatina, la regulación del *splicing* co-transcripcional, así como la maduración del ARN (Bajczyk *et al.*, 2019). Respecto a su regulación, se ha visto que el miR168 tiene como *target* a esta proteína. El pre-miR168 permite la generación de isoformas de 22 nt durante su procesamiento los cuales son cargados en AGO10. Estos miR168-AGO10 actúan sobre AGO1 y permiten la generación de más siARNs contra el gen de AGO1 amplificando así su represión (Iki *et al.*, 2018).

VIII. Alteración del silenciamiento génico durante la infección viral

Además de las defensas pasivas basadas en las barreras existentes como la pared celular rígida, las plantas muestran mecanismos de defensa activos luego de reconocer el ingreso de los virus. En este sentido, el control génico mediado por sRNAs es un mecanismo crucial, funcionando como un sistema inmune primario para las plantas (Dunoyer *et al.*, 2010; Li y Wang, 2019).

La invasión viral desencadena el silenciamiento por sRNAs mediante diferentes ARNdh inductores generados por mecanismos tales como la replicación (virus a ARN), transcripción bidireccional del genoma (virus a ADN, como los geminivirus), ARN virales estructurados e incluso por la síntesis *de novo* de ARNdh mediados por RDRp endógenas. Seguidamente, estos ARNdh son procesadas por alguna de las DCLs de la planta para formar así pequeños ARNs derivados de virus, denominados vsiRNAs (del inglés, *virus-derived small interference RNAs*; Carbonell y Carrinton, 2015; Zhang *et al.*, 2015). Estos vsiRNAs de 20-24 nt serán metilados por acción de HEN1 en sus extremos 3' protruyentes para luego ser introducidos en los complejos RISC y guiar el TGS o PTGS de ARNs virales por complementariedad de bases (Matzke y Mosher, 2014; Boualem *et al.*, 2016). Se ha demostrado que la clase de vsiRNA dominante en la defensa antiviral son aquellos de 21 nt producidos mediante DCL4 (Wang *et al.*, 2011). Por su parte, las proteínas AGO mas identificadas con la regulación antiviral han sido AGO4, involucrada en la vía de TGS, y las AGO1/2 relacionadas principalmente al PTGS (Csorba *et al.*, 2015; Li y Wang, 2019; Zhang *et al.*, 2019).

Para contrarrestar este tipo de defensa, los virus expresan proteínas con la capacidad de suprimir el silenciamiento mediado por sARNs, denominadas supresoras del silenciamiento por ARN (VSR, del inglés *viral suppressors of RNA silencing*). Estas proteínas son multifuncionales, ya que además de actuar como supresoras, tienen funciones indispensables para la replicación o el movimiento del virus en las células (Csorba *et al.*, 2015; Li y Wang, 2019; Zhang *et al.*, 2019). Actualmente se cuenta con un gran número de VSRs caracterizadas, y se ha visto que las mismas presentan una alta diversidad de secuencia y estructura, lo que dificulta el estudio y sugiere que las mismas han evolucionado de manera independiente (Csorba *et al.*, 2015; Yang y Li, 2018).

Las plantas, por su parte, han desarrollado un sistema de contra-contra-defensa, involucrando a las proteínas RDRp y SGS3 (chaperona denominada *Suppressor of Gene Silencing 3*). En *A. thaliana* se han encontrado 6 RDRp (denominadas RDRp1-6), siendo RDRp2 y RDRp6 las más relacionadas en los mecanismos antivirales (Zhang *et al.*, 2015). Estas RDRp usan ARN o ADN virales para

sintetizar ARNdh que sirve como sustrato para las DCLs. De esta manera, amplifican la señal inicial de vsiRNAs y pueden permitir la recuperación de la planta (Huang y Yi, 2018).

Las VSR han demostrado actuar en diferentes etapas del silenciamiento por sARNs de la planta (Figura 8). A continuación, se detallan algunos de los mecanismos que les permiten lograr una infección exitosa:

VIII. I. Supresión del TGS

Muchas VSR de geminivirus han demostrado ser capaces de inhibir la actividad de enzimas claves del ciclo de metilación de la célula, o de prevenir la degradación de los sustratos de esta vía. Por ejemplo, la proteína TrAP de TGMV (Tomato golden mosaic virus) y CaLCuV (Cabbage leaf-curl virus) pueden inhibir la actividad de histonas metiltransferasas para mantener los minicromosomas de estos virus en estado de eucromatina y permitir la replicación activa y transcripción de genes virales escapando así del sistema defensa de la planta (Castillo-González *et al.*, 2015). Por su parte, las proteínas AC4 de ToLCV-ND (Tomato leaf-curl New Delhi virus) y V2 de CLCuMuV (Cotton leaf-curl multan virus) interactúan con AGO4, lo cual impide la formación del RISC con esta AGO, previniendo la metilación del genoma viral (Vinutha *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019).

VIII. II. Unión o corte de ARNdh

La unión de ARNdh es uno de los mecanismos más comúnmente utilizados por los VSR. Proteínas como la P38 de TCV (Turnip crinkle virus) y NS3 de RSV (Rice strip virus), pueden unir estas moléculas y bloquear así la síntesis de vsiRNAs (Yang y Li, 2018). Por su parte, la proteína RNase3 de SPCSV (Sweet potato chlorotic stunt virus) ha demostrado una estrategia atípica que implica la unión y degradación de ARNdh y vsiRNAs en una vía dependiente de endonucleasas (Cuellar *et al.*, 2009).

VIII. III. Interferencia con DCL2/3/4, AGO1 y con el ensamble del RISC

La proteína P6 de CaMV (Cauliflower mosaic virus) interacciona con DRB4 suprimiendo la función de DCL4 y así la formación de siARNs de 21 nt (Haas *et al.*, 2008). Otra de las estrategias muy utilizadas por las VSRs es la interacción con la proteína AGO1. La proteína P38 de TCV se une a AGO1, interfiriendo con las vías de defensa en las que está implicada esta proteína (Azevedo *et al.*, 2010). Los resultados de esta interacción pueden generar la inhibición de la actividad catalítica de AGO1 (como es el caso de la proteína 2b de CMV, Cucumber mosaic virus), alterar la estabilidad de AGO1 (acción lograda por la proteína de cubierta, CP, de Tomato ringspot virus ToRSV), o incluso, inducir la degradación autofágica de AGO1 como es el caso de la proteína F-box P0 de polerovirus (Baumberger *et al.*, 2007; Bortolamiol *et al.*, 2007). La proteína p19 de TBSV (Tomato bushy stunt virus) además de unir vsiRNAs, puede regular negativamente la expresión de AGO1 al generar la sobre-expresión del miR168, cuyo *target* es AGO1. La proteína P38, ha demostrado, además, capacidad para suprimir la actividad de las proteínas DCL3 y DCL4 (Qu *et al.*, 2003; Deleris *et al.*, 2006).

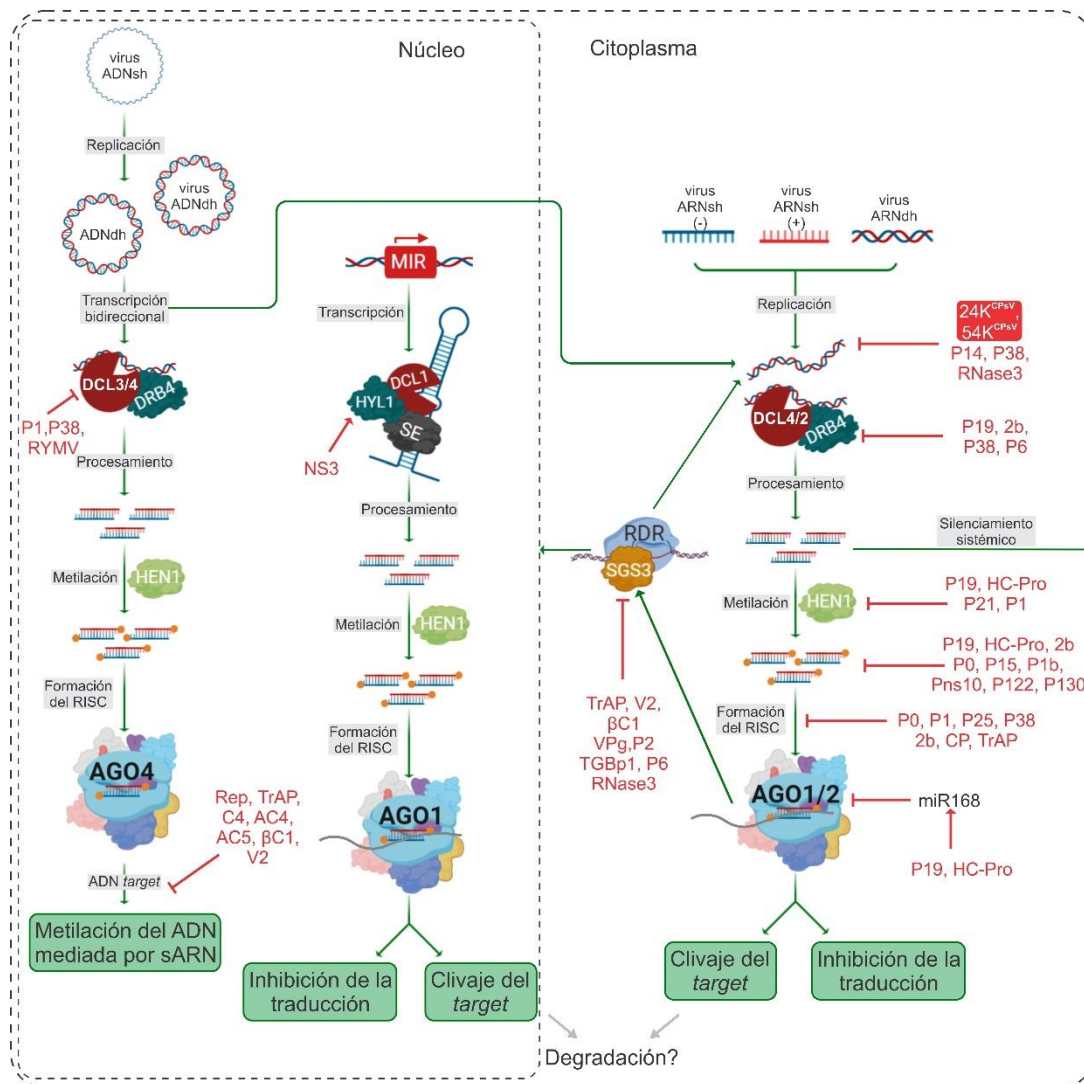


Figura 8: Representación esquemática de las vías de silenciamiento mediado por ARN suprimidas por virus en plantas. La infección por virus a ADNsh induce la metilación del ADN mediado por sRNAs. Por su parte, los virus con genomas a ARN (+), ARN (-) o ARNdh, producen intermediarios ARNdh durante la replicación viral, los cuales sirven como inductores del PTGS y finalmente provocan el clivaje de sus propios ARNs virales o la inhibición de la traducción de los mismos. Estas vías involucran principalmente a las proteínas AGO1-2-4, DCL1-3-4, DRB1 y 4, HEN1, RDR6 y SGS3 por parte de la planta.

Las proteínas virales con actividad VSR se indican en color rojo. Las mismas interfieren en diferentes pasos de las vías del silenciamiento, ya sea por inhibición (indicado con flechas rojas de punta truncada) o estimulando la generación de sRNAs (indicado con flechas rojas). Si bien hay numerosos reportes de alteración en la acumulación de miARNs por infecciones virales, el caso de la proteína NS3 de RSV representa el único VSR en el que se ha demostrado la interacción con proteínas de la maquinaria de procesamiento de miARNs.

Las VSRs de CPsV se representan en una caja roja.

Los detalles de cada vía se describen en el texto (apartados VIII y IV). Adaptado de Li y Wang, 2019.

VIII. IV. Interferencia con el silenciamiento mediado por miARNs

Muchos reportes relacionan a las VSRs con interferencia de la regulación mediada por miARNs a nivel post-transcripcional afectando la acumulación de

especies maduras y su función efectora (Amin *et al.*, 2011; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2013). Para un grupo reducido de ellas se ha identificado una interferencia con las vías de biogénesis de miARNs. La proteína NS3 de RSV es, hasta el momento, la única VSR de virus vegetales para la cual se ha encontrado interacción específica con la maquinaria de procesamiento de miARN (DCL1, HYL1, SE) (Zheng *et al.*, 2017). En dicho trabajo se propone que NS3 actúa como un andamiaje entre DRB1 y algunos pri-miARNs facilitando su procesamiento. De esta forma, NS3 estimula la síntesis de miARNs que poseen como *target* genes de resistencia a patógenos, promoviendo la infección viral y patogénesis en arroz (Zheng *et al.*, 2017).

Se ha informado que la expresión de VSRs puede producir defectos en el desarrollo y manifestaciones similares a síntomas, probablemente interfiriendo con la biogénesis de miARNs (Chapman *et al.*, 2004; Dunoyer *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2004). Kasschau y colaboradores (2003) demostraron que la proteína supresora P1/HC-Pro de TuMV interfiere en la regulación mediada por miARNs de al menos 10 ARNm *targets* en plantas de *A. thaliana* infectadas o transgénicas. La expresión de P1/HC-Pro causó múltiples defectos en el desarrollo de las plantas, incluidos algunos similares a los asociados con mutantes DCL1. En este sentido, Bazzini y colaboradores (2007) mostraron que la expresión de la proteína de movimiento y la proteína de cápside de TMV provocaban síntomas de enfermedad y problemas en el desarrollo de plantas de *N. tabacum*. Estos resultados sugieren que la interferencia directa del procesamiento de miARNs podría ser una característica general de la patogénesis viral que podría llevar a la producción de sintomatología (Bazzini *et al.*, 2009).

VIII. V. Interferencia con HEN1 y secuestro de siARNs

Como se mencionó anteriormente, los sARNs deben ser metilados en sus extremos 3' por medio de HEN1 para impedir que sean degradados. Este punto crucial de la vía de silenciamiento mediado por sARNs es alterado por VSRs como HC-Pro (del virus zucchini yellow mosaic virus, ZYMV), la cual puede interactuar con HEN1 e inhibir su actividad metiltransferasa (Jamous *et al.*,

2011). HC-Pro y otras VSRs, como p21 de Beet yellow virus (BYV), p19 de TBSV, 2b de CMV o p37 del PLPV (Pelargonium line pattern virus), también pueden secuestrar vsRNAs previo al paso de metilación por parte de HEN1 (Yu *et al.*, 2006; Burguán *et al.*, 2011; Duan *et al.*, 2012; Pérez-Cañamás y Hernández, 2015). Este, es uno de los mecanismos más comunes utilizados por parte de los VSRs para suprimir el silenciamiento por ARN.

VIII. VI. Interferencia con la amplificación del silenciamiento por sARNs; vía RDR/SGS3

Como se mencionó anteriormente, las plantas han desarrollado un sistema de contra-contra-defensa mediado por RDRp/SGS3, que muchas veces les permite sortear las desregulaciones provocadas por la infección viral y recuperarse de los síntomas que han sufrido. Sin embargo, algunas de las VSRs estudiadas han demostrado tener la capacidad de interferir también con esta vía de amplificación. Algunos ejemplos de ello son, AC2, V2 y β C1 (tres VSRs de geminivirus) y HC-Pro, que tienen como *target* a las proteínas RDRp6 y SGS3 (Okano *et al.*, 2014; Li y Wang, 2019). Por su parte, β C1 ha demostrado también la capacidad de generar la sobre-expresión de un supresor del silenciamiento endógeno, rgsCaM (una *calmodulin-like protein*), la cual inhibe la expresión de RDRp6 y media la degradación autofágica de SGS3 (Li *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019).

Pese al incremento en el conocimiento de los mecanismos por los cuales las VSRs actúan en las plantas para generar un ambiente propenso en donde los virus puedan replicarse y lograr una infección, muchos de ellos quedan aún por dilucidar. Para revisiones detalladas de las VSRs y sus mecanismos de acción puede consultarse las siguientes publicaciones: Carbonell y Carrington, (2015); Csorba *et al.*, (2015); Zhang *et al.*, (2015); Zhang *et al.* (2019); Li y Wang, (2019).

IX. Las proteínas de CPsV como supresoras del silenciamiento por ARN

Como se mencionó anteriormente, trabajos previos de nuestro laboratorio han caracterizado las proteínas virales 24K^{CPsV} y 54K^{CPsV} como supresoras del silenciamiento génico mediado por ARN (Reyes *et al.*, 2016; Robles Luna *et al.*, 2017).

Los ensayos realizados por Robles Luna y colaboradores (Figura 9; 2017) indican que las proteínas 24K^{CPsV} y 54K^{CPsV} interfieren con el silenciamiento local (Figura 9. A-B) y sistémico en plantas de *N. benthamiana*. A su vez, demostraron que ambas proteínas tienen la capacidad de unir ARNdh largos (114 nt; Figura 9. C) pero no cortos (21 nt) mediante ensayos *in vitro*. Este hecho podría estar relacionado con una inhibición del silenciamiento previa a la generación de sRNAs por parte de la planta (Figura 8; Robles Luna *et al.*, 2017).

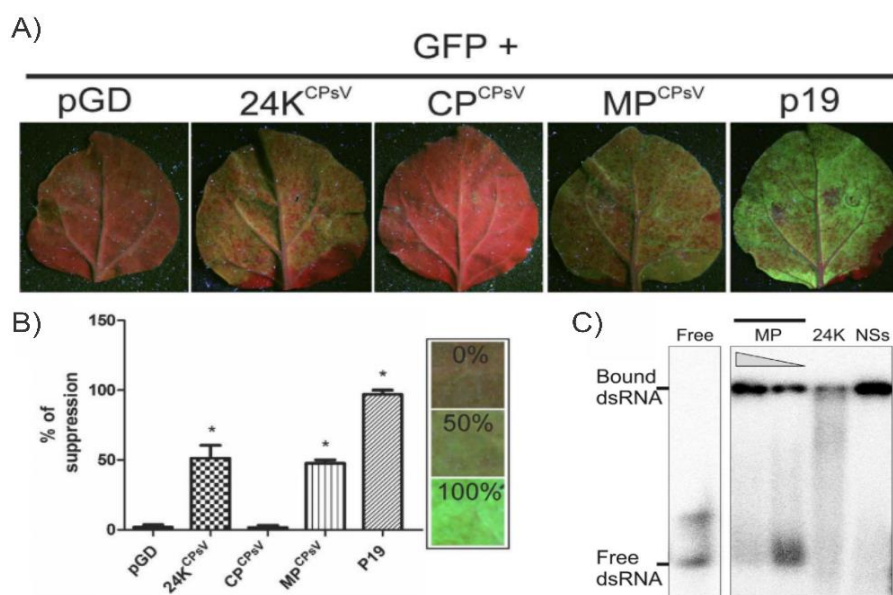


Figura 9: Evaluación de la capacidad de supresión del silenciamiento génico local de las proteínas de CPsV.

A. Expresión de GFP en plantas de *N. benthamiana* *wild-type* agroinfiltradas con plásmidos binarios llevando la proteína reportera GFP y/o las proteínas virales de CPsV, 5 días post-agroinfiltración. Se muestran, además, el vector vacío (pGD) usado como control negativo y la proteína P19 como control positivo de VSR. **B.** Cuantificación del porcentaje de supresión de las proteínas de CPsV, expresado como porcentaje de fluorescencia para cada construcción. * indica diferencias significativas con $P < 0.05$ con respecto al control negativo pGD usando *t-test*. **C.** Ensayos de cambios en la movilidad electroforética (EMSA) de ARNdh largos (114 nt) en presencia de extractos purificados de las proteínas MP (o 54K^{CPsV}) y 24K^{CPsV}. La proteína NSs de GRSV (Groundnut ringspot virus) se utilizó como control positivo. La proteína MP se ensayó a 2 concentraciones 2.7 μ M y 1.12 μ M, mientras que 24K^{CPsV} solo a 1.12 μ M. El control negativo utilizado fue el buffer de reacción, indicado como *Free*. Tomado y modificado de Robles Luna y colaboradores (2017).

Por su parte, los ensayos de Reyes y colaboradores (2016) realizados en plantas de *C. sinensis* infectadas con CPsV, evidenciaron un rol principal de la proteína 24K^{CPsV} en la desregulación de un grupo de 10 miARNs evaluados mediante ensayos de *Northern blot*. En dicho trabajo, se estudió la acumulación de 9 miARNs conservados en plantas (miR156, miR164, miR166, miR167, miR169, miR171, miR172, miR390 y miR393) y un miARN evolutivamente reciente, el miR403. Los resultados indicaron que 7 de esos 10 miARNs (miR156, miR167, miR169, miR171, miR172, miR393, miR403) disminuyen su acumulación en plantas infectadas respecto a plantas sanas (Figura 10).

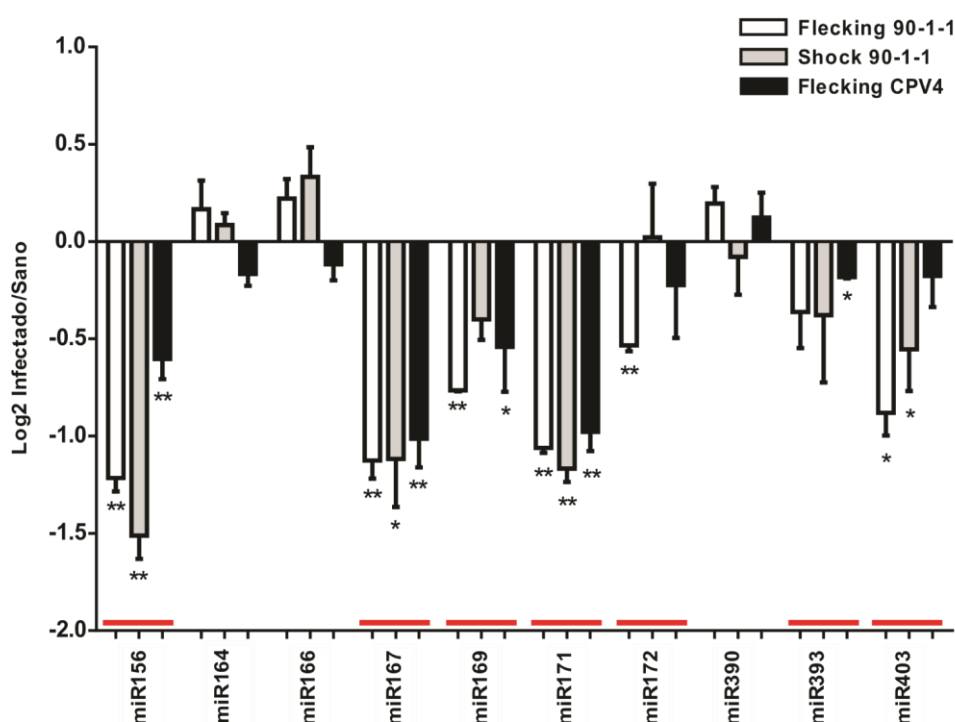


Figura 10: Acumulación de miARNs endógenos en plantas de *C. sinensis* infectadas con dos aislamientos de CPsV. Muestras de naranjo infectadas con el aislamiento argentino 90-1-1 o el norteamericano CPV-4 fueron utilizadas para evaluar la acumulación relativa de miARNs en comparación con plantas sanas (Sano=1). Se grafica el log₂ de la relación infectado/sano para cada una de las condiciones a partir de tres experimentos independientes de *Northern blot*. La diferencia entre los grupos se analizó mediante un *t-student*. * indica valores $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ en comparación con la muestra sana. Las líneas rojas indican los miARNs que presentaron diferencias significativas en al menos una de las muestras infectadas respecto al control sin inocular. Modificado de Reyes *et al.*, 2016.



HIPÓTESIS GENERAL

Hipótesis general

El virus de la psorosis de los cítricos altera los mecanismos de biogénesis de miARNs en plantas de *Citrus sinensis*, ya sea mediante interacción de sus proteínas con pre-miARNs y/o mediante interacción con proteínas de la maquinaria de procesamiento celular, provocando la generación de síntomas.



OBJETIVOS GENERALES

Objetivos generales

En los últimos años, se ha profundizado en el conocimiento de las funciones y localizaciones subcelulares de las proteínas de CPsV por parte de nuestro grupo. Se ha podido caracterizar a dos de sus proteínas (54K^{CPsV} y 24K^{CPsV}) como supresoras virales, aunque los mecanismos por los cuales llevan a cabo su función han sido poco explorados. En este trabajo de Tesis nos propusimos investigar aspectos concernientes a la biogénesis y acumulación de miARNs de *C. sinensis* y su relación con la infección viral. De esta forma, nos focalizamos en el estudio del mecanismo de procesamiento de precursores de miARNs de naranjo dulce y su alteración mediada por proteínas del virus de la psorosis de los cítricos.

A continuación, se detallan los objetivos específicos que se plantearon para abordar este análisis:

- Caracterizar a nivel de secuencia y estructura 10 familias de pre-miARNs de *C. sinensis*.
- Estudiar la acumulación de pre-miARNs en muestras provenientes de plantas de *C. sinensis* infectadas con CPsV y su interacción con proteínas virales.
- Estudiar la acumulación de transcritos *targets* de miARNs y su relación con la sintomatología en plantas de *C. sinensis* infectadas con CPsV.
- Analizar la interacción entre la proteína 24K^{CPsV} y proteínas de la maquinaria de procesamiento de miARNs.



CAPÍTULO 1:

Caracterización de 10 familias de pre-miARNs en
plantas de naranjo dulce

Introducción

Desde el descubrimiento del primer miARN, *lin-4* en *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (Lee *et al.*, 1993) hasta la fecha, el conocimiento relacionado a estas moléculas regulatorias ha crecido enormemente. Los desarrollos tecnológicos como la secuenciación masiva y los avances de la bioinformática, permitieron año a año expandir dicho conocimiento. miRBase es la base de datos de miARNs publicados más importante (<http://www.mirbase.org/>). Actualmente existen más de 48.000 miARNs maduros cargados en ella, pertenecientes a 271 organismos. Particularmente, en *C. sinensis* se han identificado más de 150 (Kozomara *et al.*, 2019).

Los genes MIR se agrupan en familias que incluyen diferentes *loci*. La clasificación se realiza basándose en la secuencia del miARN maduro y/o en su estructura secundaria. En general, miembros de una misma familia tienen funciones similares debido a la conservación en la secuencia madura, aun variando el resto de la secuencia del precursor (Meyers *et al.*, 2008; Kamanu *et al.*, 2013). En plantas dicotiledóneas hay 29 familias de miARNs conservados (Cuperus *et al.*, 2011; Chavez Montes *et al.*, 2014). Sin embargo, este número puede variar dependiendo de si, por ejemplo, las familias miR156/157, miR170/171 o miR159/miR319 son consideradas diferentes o una única superfamilia (Chorostecki *et al.*, 2017). Se plantea que el origen de las mismas es a partir de duplicaciones de un *locus* original de un miARN conservado, pudiendo generar familias numerosas. Tal es el caso de la del cs-miR169 que está compuesta por 14 miembros. A su vez muchos miARNs han aparecido recientemente en la evolución y, por lo tanto, se identifican solo en un número pequeño de especies (Axtell, 2008; Axtell y Bowman, 2008). Estos se denominan miARN evolutivamente jóvenes y, en general, se encuentran representados por genes de copia única en el genoma.

Como se detalló en la Introducción, la biogénesis de miARNs de plantas comprende el procesamiento adecuando del pre-miARN para liberar un miARN maduro funcional. Cualquier modificación o corrimiento en los sitios de corte

generados por DCL1 llevarían a la generación de especies maduras no funcionales o cuyos genes blanco podrían ser diferentes. Los mecanismos de procesamiento en plantas, han sido descritos principalmente empleando mutagénesis dirigida y caracterizados mediante el uso de una versión modificada de la técnica 5'RACE (Bologna *et al.*, 2009; Mateos *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2010; Werner *et al.*, 2010). Años más tarde, se desarrolló una técnica que permite estudiar los pre-miARNs de forma grupal y específica, denominado SPARE (del inglés *Specific Parallel Analysis of 5'RNA Ends*; Bologna *et al.*, 2013b). Esta técnica permitió dilucidar con mayor fidelidad los mecanismos de procesamiento (*base to loop* o *loop to base*) de los pre-miARNs en *A. thaliana*, el número y posición de cortes realizados por DCL1 y, a su vez, distinguir posibles alteraciones en el procesamiento, por ejemplo, mediante la utilización de plantas mutantes (Bologna *et al.*, 2013b; Moro *et al.*, 2019).

El trabajo de Chorostecki y colaboradores (2017) ha permitido caracterizar la biogénesis de miARNs individuales a lo largo de la evolución para diferentes especies de plantas, entre las que se incluyó a *C. sinensis*. A partir de estos estudios, se han identificado distintos mecanismos de procesamiento conservados en 36 especies de plantas y se ha propuesto que los mismos vienen determinados por huellas evolutivamente conservadas. Del análisis de estas marcas evolutivas se deduce que están íntimamente relacionadas con el plegamiento que adoptan los precursores, por lo que se las refiere como “determinantes estructurales” (Song *et al.*, 2010; Bologna *et al.*, 2013b; Zhang *et al.*, 2015; Chorostecki *et al.*, 2017; Moro *et al.*, 2018). La Figura 11 muestra un ejemplo de dicho análisis para dos miembros de la familia del miR171. La misma resume a través de la herramienta de visualización Circos (Krzywinski *et al.*, 2009), datos de alineamientos de secuencia, estructura secundaria e información propia de los miARNs maduros para 36 especies de plantas (Chorostecki *et al.*, 2017).

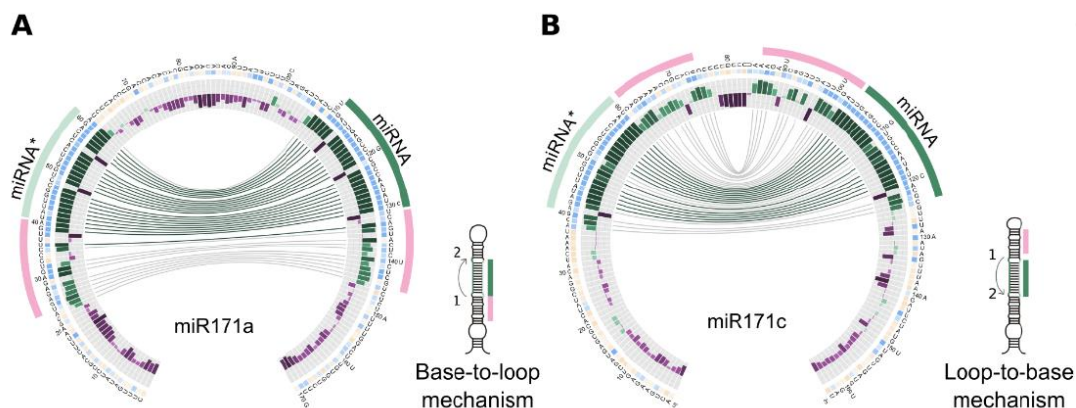


Figura 11: Conservación evolutiva en los mecanismos de procesamiento. Representación de Circos de **A.** miR171a, y **B.** miR171c. La figura, esquematiza el procesamiento de dos miembros de la familia del miR171 para 30 dicotiledóneas y 6 monocotiledóneas. La misma, indica la existencia de diferentes mecanismos de procesamiento dentro de una misma familia y su conservación evolutiva. El miR171a se procesa desde la base, mientras que el miR171c lo hace desde el bucle. La conservación de secuencia se indica en cuadrados azules/amarillos, cuya información se obtiene de la herramienta T-coffee. A su vez, la posición de las regiones conservadas adicionales por fuera del dúplex miARN/miARN* (línea verde) se indican en línea rosa y varía dependiendo la dirección de procesamiento. Las barras verdes indican bases que tienden a formar regiones de ARNdh. Las barras moradas se refieren a bases que tienden a formar regiones de ARNsh. Las líneas de conexión se refieren a bases que interactúan en la estructura secundaria de los precursores basados en datos de RNAfold (las verdes se refieren a bases que interactúan al 100%, las grises muestran bases que interactúan en al menos el 50% de los casos en las secuencias de las 36 especies de plantas analizadas). Tomado de Chorostecki *et al.*, 2017.

Si bien desde el descubrimiento de los miARN de plantas se ha señalado que la conservación de secuencia en especies distantes es clara solamente en la región miARN/miARN* (Reinhart *et al.*, 2002), algunos de los datos publicados por Chorostecki y colaboradores (2017) han demostrado que la conservación de secuencia a menudo coexiste con la conservación de estructura secundaria. En el mismo trabajo, se reportan resultados indicando que mutaciones compensatorias sobre la secuencia del pre-miARN que no alteran su estructura secundaria, no interfieren con su procesamiento. Estos resultados concuerdan con los datos experimentales que muestran que es la estructura del precursor la que se reconoce durante la biogénesis de miARN (Cuperus *et al.*, 2010; Mateos *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2010; Werner *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha demostrado que, por ejemplo, el pre-miR319 alberga una segunda región conservada en el tallo sobre el dúplex miARN/miARN* (Palatnik *et al.*, 2003; Axtell y Bartel, 2005; Addo-Quaye *et al.*, 2009; Bologna *et al.*, 2009), lo que demuestra que existen secuencias conservadas adicionales en al menos algunos pre-miARNs.

Objetivos

En este capítulo se pretende caracterizar las familias de precursores de 10 miARNs en *C. sinensis*, 7 de los cuales demostraron una disminución en la acumulación en plantas infectadas con CPsV respecto de las sanas. Dentro de estas 10 familias, 9 pertenecen a miARNs conservados, mientras que el restante pertenece al grupo de los miARNs evolutivamente jóvenes.

En particular se buscarán regiones de conservación en la secuencia de los integrantes de cada familia y, se dilucidará el mecanismo de procesamiento por el cual la maquinaria de la planta libera el miARN maduro mediante la detección de determinantes estructurales característicos.

Resultados

I. Estudio de las familias de precursores de los miARNs: miR156, miR164, miR166, miR167, miR169, miR171, miR172, miR390, miR393 y miR403

I. I. Análisis de la conservación de secuencia de las familias de precursores estudiadas

Haciendo uso de la base de datos *C. sinensis* anotación Project (<http://citrus.hzau.edu.cn/orange/>; Xu *et al.*, 2010), se obtuvieron las secuencias de precursores de miARNs de 10 familias de *naranja dulce*: miR156, miR164, miR166, miR167, miR169, miR171, miR172, miR390, miR393 y miR403. A su vez, se utilizaron datos provenientes de una revisión de la anotación de las mismas, realizado años más tarde utilizando muestras de diferentes tejidos (raíz, fruto, meristemas, tallo, hojas) de plantas de naranja en distintos estadios de crecimiento (Taylor *et al.*, 2017).

El modelo de estructura secundaria básico para los precursores de miARNs de plantas incluye tres partes y cinco regiones: (1) un vástago inferior que es parcialmente estructurado que comprende a las regiones *F1* y *F2*; (2) la zona de ARNdh correspondiente al dúplex miARN/miARN* (regiones *m* y *m**, respectivamente); y (3) un bucle terminal correspondiente a la región *F3* (Figura 12; Werner *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012).

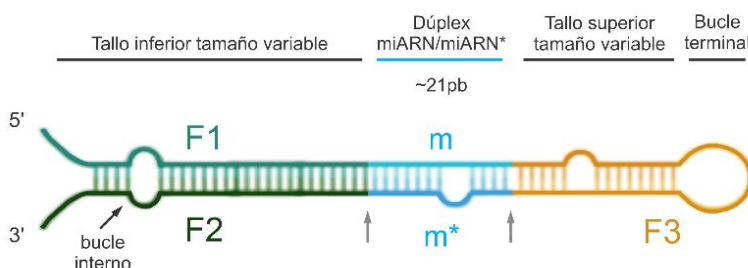


Figura 12: Esquema representativo de un pre-miARN de planta. El mismo puede dividirse en tres partes principales: un tallo inferior que alberga los extremos 3' y 5', un dúplex de ARNdh que contiene al miARN maduro y, finalmente, un tallo superior que culmina con un bucle terminal. En plantas, generalmente el dúplex presenta un tamaño constante, mientras que el resto del pre-miARN puede variar en gran medida. Adaptado de Liu *et al.*, 2012.

Buscando identificar regiones de secuencia conservadas entre los distintos miembros de las familias estudiadas, se realizaron alineamientos utilizando del programa *T-Coffee* (Chang *et al.*, 2014; *M-Coffee alignment*; <http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:mcoffee>). Esta herramienta nos permitió comparar a los miembros de una misma familia de precursores y se verificó que todos poseían una identidad de secuencia muy alta en la región miARN/miARN*. El resultado obtenido se usó posteriormente como *input* del programa *WebLogo* (<https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>; Crooks *et al.*, 2004), de forma de poder visualizar la conservación de la secuencia de la familia posición por posición basándonos en el alineamiento previo (Figuras 13-15). A continuación, se detallan los resultados obtenidos para cada familia.

I. I. A. Familia del miR156

Dentro de la familia del miR156 de *C. sinensis* han sido identificados 7 miembros mediante metodologías de secuenciación masiva (miR156a-g) (Xu *et al.*, 2010; 2013; Taylor *et al.*, 2017). Entre ellos, pre-miR156a es el miembro más abundante, representando 20 veces la acumulación de pre-miR156b y casi 400 veces la de los demás integrantes de la familia (Xu *et al.*, 2013).

Al comparar la secuencia de estos precursores observamos que, a excepción del pre-miARN156d que posee un tamaño de 101 nt, el resto de los integrantes de la familia tienen un tamaño comparable de 143-147 nt. En todos ellos vemos que el *m* se encuentra a ~31 nt desde el extremo 5' y es de 20 nt. Luego le sigue la región denominada *F3*, que varía entre los 40-43 nt con excepción del miR156c que presenta un largo de 48 nt en *F3*. El *m** es de 20 nt, y la región *F2* al igual que la *F1*, comprende 31 nt. El pre-miR156d, posee las regiones *m*, *F3* y *m** de longitudes similares a las de los demás, pero sus extremos *F1* y *F2* se diferencian mucho, con 10 nt y 8 nt respectivamente.

Como era de esperar en la secuencia consenso generada, las regiones más conservadas fueron las correspondientes al miARN maduro y miARN*. A su vez, se observa una secuencia de ~20 nt sobre la región *F3*, que muestra posiciones conservadas dentro de la familia (indicadas con un recuadro gris; Figura 13. A).

Esta secuencia podría dar origen a los determinantes estructurales relacionados al procesamiento en sentido *loop to base*.

I. I. B. Familia del miR164

Xu y colaboradores (2013) describieron la presencia de 4 miembros (pre-miR164a-d) en esta familia de precursores de *C. sinensis*. Sin embargo, análisis posteriores demostraron que el pre-miR164b era una repetición del pre-miR164a (Taylor *et al.*, 2017). Por lo tanto, la familia cuenta con 3 integrantes, los pre-miR164a, c y d, siendo el miembro más abundante el pre-miR164a (Xu *et al.*, 2013). En este caso, los precursores tienen un tamaño de 142, 151 y 188 nt respectivamente. Los precursores a y d comparten gran parte de la secuencia en las regiones *F1* (30 nt), *m* (21 nt), *m** (21 nt) y *F2* (30 nt), mientras que la región *F3* es bastante más variable tanto en secuencia como en tamaño 40-49 nt. En el caso del pre-miR164c, por el contrario, se observan regiones *F1* y *F2* de 10 y 8 nt respectivamente, y la región *F3* presenta un largo marcadamente mayor de 128 nt.

La secuencia consenso obtenida mediante *WebLogo* en este caso, refleja la diferencia en el largo de estos precursores identificándose *gaps* tanto en las regiones *F2* como *F3*. Además, cabe destacar que la región *m** se conservó solamente en un ~50% (Figura 13. B). Si bien la región *F1* presentó una alta conservación, el resto de las posiciones conservadas se distribuyeron a lo largo del precursor consenso, sin una clara indicación de dónde podrían encontrarse determinantes estructurales que revelen su procesamiento.

I. I. C. Familia del miR166

Por su parte, se reportó que la familia del pre-miR166 cuenta con 10 miembros (pre-miR166a-j; Xu *et al.*, 2013). Sin embargo, durante la revisión de la anotación de miARNs realizada por Taylor y colaboradores (2017), se planteó la inquietud de que el pre-miR166h no sería un integrante genuino, ya que no se obtuvieron lecturas sobre este precursor para ninguna de las muestras evaluadas.

El tamaño de la secuencia de estos precursores va desde los 100 nt hasta los 222 nt. Como era de esperar frente a esta disparidad, las regiones *F1*, *F2* y *F3*

presentaron tamaños muy variados (9-33, 7-31 y 37-120 nt respectivamente). Por su parte, las regiones *m* y *m** demostraron un tamaño constante de 21 nt. La secuencia consenso presentó una zona de conservación solo en la región *F3* con bases cuya frecuencia relativa rondaba el 50% en muchos de los casos (Figura 13. C). El resto de la secuencia presentó muy poca conservación, lo que impide inferir un mecanismo de procesamiento.

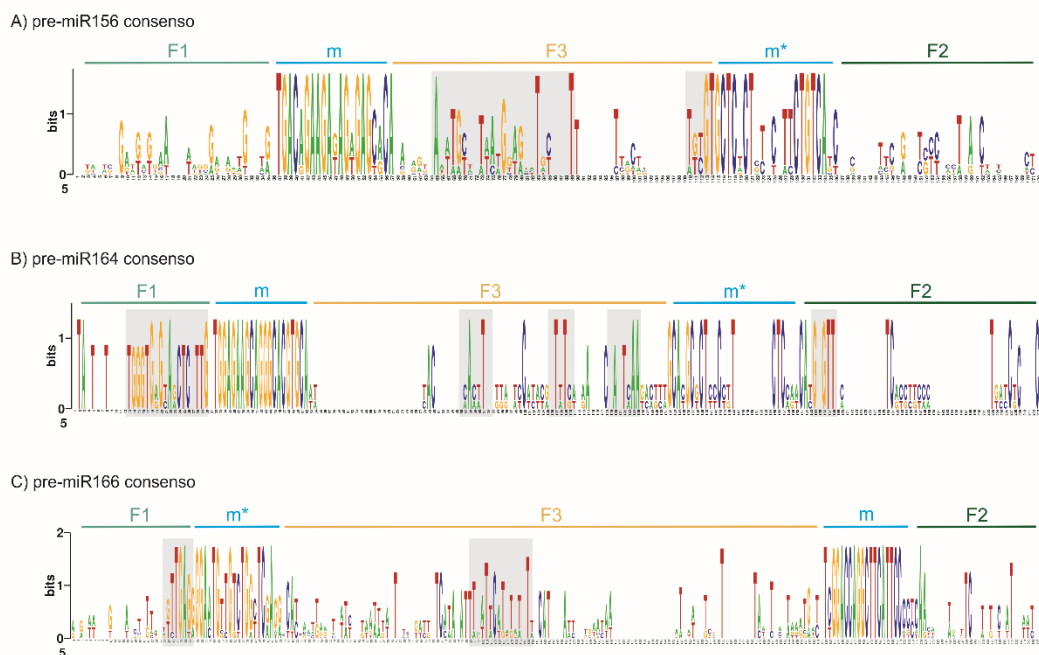


Figura 13: Logotipos para las secuencias consenso de pre-miARNs de las familias estudiadas de *C. sinensis*. Los logotipos obtenidos mediante el programa WebLogo representan la secuencia consenso generadas a partir de un alineamiento previo de las mismas realizado usando el programa T-Coffee. En este caso, se muestran los resultados para las familias de precursores de los miARNs **A.** 156, **B.** 164 y **C.** 166. Se indican las distintas regiones de los precursores (*F1*, *F2*, *F3*, *m* y *m**). Los recuadros en color gris indican bases con una alta frecuencia de conservación para dichas posiciones.

I. I. D. Familia del miR167

Dentro de la familia del miR167 de *C. sinensis* han sido identificados 4 miembros mediante metodologías de secuenciación masiva (miR167a-d). El pre-miR167d es el precursor más representado, duplicando la acumulación del pre-miR167a y con una expresión de más de 150 veces la de los restantes miembros.

La longitud de los precursores varió entre 87-167 nt. La región *F3* presenta un tamaño de ~33 nt a excepción del pre-miR167d, que es de 62 nt. La región del

dúplex mostró un tamaño de ~21nt. Las regiones *F1/F2* presentaron un tamaño de ~30 nt, con excepción del pre-miR167a, en el cual fueron de ~10 nt.

La secuencia consenso obtenida para esta familia revela una muy baja conservación a lo largo del bucle *F3*, mientras que aumenta hacia las regiones *F1* y *F2*, lo que podría indicar la presencia de determinantes estructurales sobre la región del tallo, característico de un procesamiento del tipo *base to loop* (Figura 14. A)

I. I. E. Familia del miR169

Si bien esta familia posee el mayor número de precursores de las familias estudiadas en este trabajo, 14 –pre-miR169a-n– (Xu *et al.*, 2013), el análisis de Taylor y colaboradores (2017) indicó la falta de lecturas sobre los precursores *a*, *e*, *g*, *h*, *i* y *j*. En *A. thaliana*, se ha demostrado que varios de los integrantes de la familia se transcriben en tándem (Li *et al.*, 2010). En este caso particular, el pre-miR169n cuya secuencia es de 334 nt, presenta dos *clusters* de este *loci*, lo que podría indicar un comportamiento similar al de la planta modelo (Taylor *et al.*, 2017). El integrante más representado de la familia es el pre-miR169d.

Las secuencias obtenidas para estos precursores presentaron un tamaño muy variado, desde 153 nt a 334 nt. El tamaño de las regiones *F1/F2* varió entre 10-37 nt y la región *F3* de 50-142 nt. Por su parte, el dúplex *m/m** mostró un tamaño homogéneo de 21 nt.

Pese a las variaciones de tamaño, la secuencia consenso mostró conservación sobre las regiones *F1* y *F2*, además del dúplex *m/m**. La región *F3*, en cambio, no mostró frecuencias de conservación considerables y gran parte de la misma posee *gaps*, lo que podría relacionarse con un procesamiento del tipo *base to loop* para la familia (Figura 14. B).

I. I. F. Familia del miR171

La secuenciación masiva permitió detectar 7 integrantes para esta familia en naranjo, pre-miR171a-g, de los cuales el pre-miR171a demostró ser el más representado (Xu *et al.*, 2013; Taylor *et al.*, 2017).

Los precursores presentan un tamaño de entre 138-158 nt, con excepción del precursor *g* marcadamente menor, con un tamaño de 99 nt. Las regiones *F1* y *F2* son de 30 nt, excepto en el pre-miR171*g* que son de 11 y 7 respectivamente. Por su parte, la región *F3* es de ~41 nt en toda la familia excepto los precursores *b* y *e*, que son de 55 y 62 nt respectivamente. Las regiones *m* y *m** tienen un largo constante de 20 nt en todos los integrantes.

La secuencia consenso muestra regiones conservadas sobre la región *F3* y las mismas se encuentran separadas por ~21 nt. Esto podría indicarnos un procesamiento en sentido *loop to base* secuencial, con dos cortes previos a la liberación del maduro (Figura 14. C).

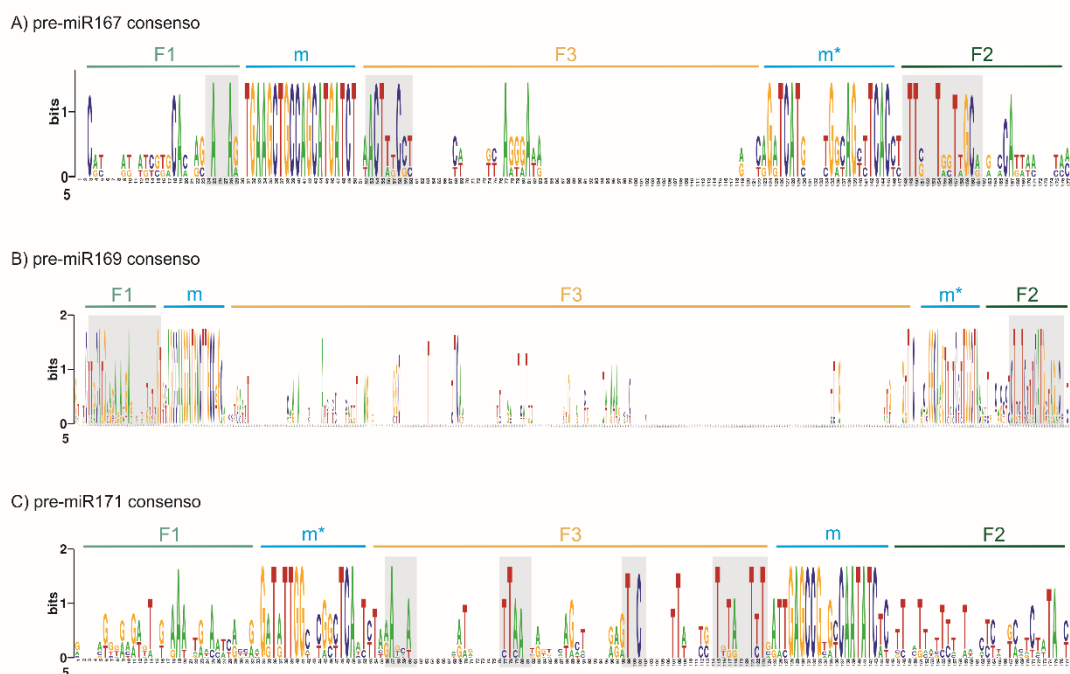


Figura 14: Logotipos para las secuencias consenso de pre-miARNs de las familias estudiadas de *C. sinensis*. Los logotipos obtenidos mediante el programa WebLogo representan la secuencia consenso generadas a partir de un alineamiento previo de las mismas realizado usando el programa T-Coffee. En este caso, se muestran los resultados para las familias de precursores de los miARNs **A.** 167, **B.** 169 y **C.** 171. Se indican las distintas regiones de los precursores (*F1*, *F2*, *F3*, *m* y *m**). Los recuadros en color gris indican bases con una alta frecuencia de conservación para dichas posiciones.

I. I. G. Familia del miR172

Para el caso de la familia del miR172, han sido identificados 4 precursores (pre-miR172*a*, *c*, *d* y *e*). El integrante más representado es el pre-miR172*a*.

El tamaño de los precursores varía entre los 149 y 191 nt. La región *F3* presentó un tamaño variable de entre 57-89 nt, mientras que las regiones *m/m** fueron de ~21 nt. El tallo correspondiente a las regiones *F1/F2* fue de 30 nt, a excepción del precursor pre-miR171c, en donde el tallo fue de ~12 nt.

La secuencia consenso en este caso indica una zona conservada sobre la región del tallo inferior *F1/F2*. A su vez, muchas de las posiciones ubicadas sobre el bucle terminal mostraron tener una alta frecuencia de aparición (Figura 15. A). La tendencia de conservación indica una relación con el procesamiento en sentido *base to loop*. Pese a presentar conservación en la región *F3*, el tamaño de este segmento no se correspondería con un procesamiento llevado a cabo desde el bucle.

I. I. H. Familia del miR390

Esta es una familia formada por solo 2 precursores, los pre-miR390a y *b*, siendo el primero el más representado de ambos. El tamaño de ambas es el mismo, 159 nt, con las regiones *F1* y *F2* de 30 nt, *m/m** de 21 nt y *F3* de 57 nt. En la secuencia consenso se observa un 75% de las posiciones con el 100% de conservación. Detectar determinantes estructurales dentro de las secuencias resulta difícil en esta condición, ya que existe un alto grado de conservación (Figura 15. B). Pese a ello, el largo de la región *F3* no se correspondería con el esperado para un procesamiento del tipo *loop to base*, por lo que se podría inferir un procesamiento desde la base al bucle.

I. I. I. Familia del miR393

Por su parte, esta familia está formada por 3 miembros, pre-miR393a, *b* y *c*. El más representado es el pre-miR393b. El tamaño de los precursores varía desde 101 nt a 174 nt, presentando una longitud constante de 22 nt para la región del maduro y 21 nt para *m**. La región *F3* presenta una longitud de 42 nt para el caso del pre-miR393a y *c*, en tanto que en el pre-miR393b cuenta con 69 nt. *F1* y *F2* en cambio, mostraron igual longitud para los precursores *b* y *c* (30 nt), mientras que fue de 9 nt para el caso del precursor *a*.

La secuencia consenso obtenida en este caso, indica conservación tanto en las regiones del tallo como en el bucle terminal en donde la mayoría de las posiciones alcanzan el 100% (Figura 15. C). El comportamiento de esta familia se relaciona de mejor manera con un procesamiento del tipo *base to loop*.

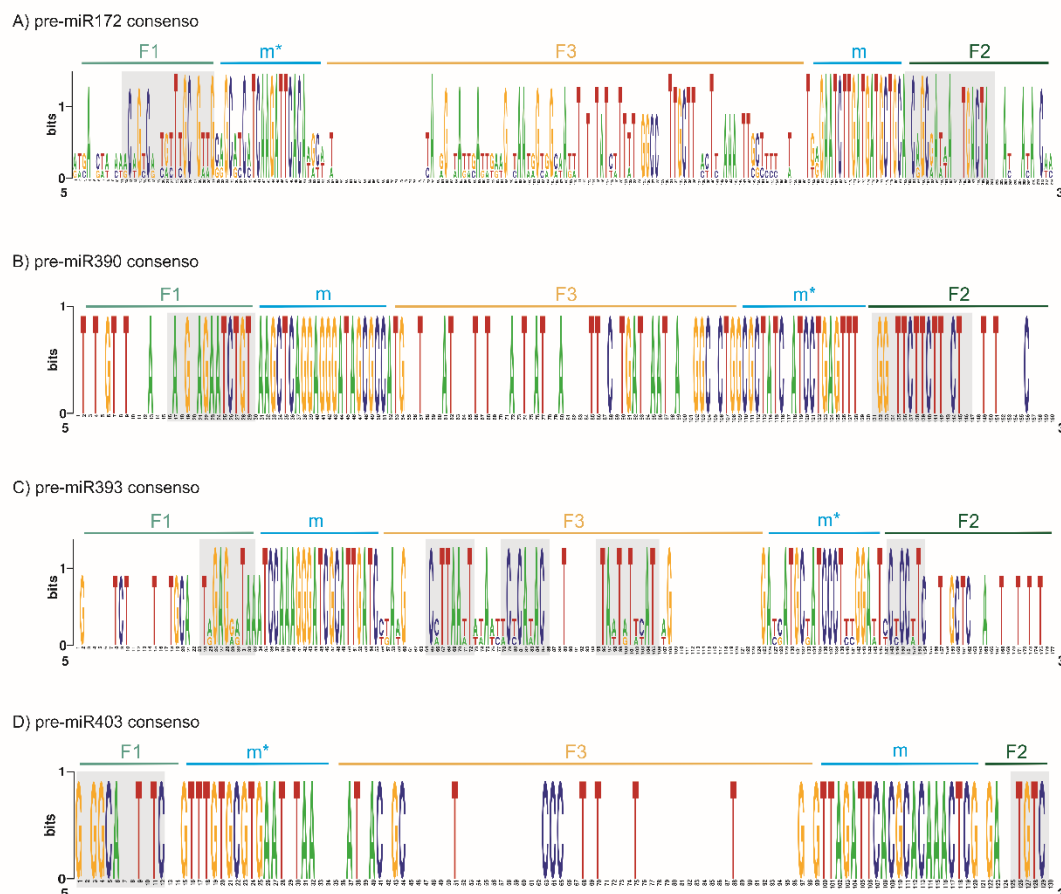


Figura 15: Logotipos para las secuencias consenso de pre-miARNs de las familias estudiadas de *C. sinensis*. Los logotipos obtenidos mediante el programa WebLogo representan la secuencia consenso generadas a partir de un alineamiento previo de las mismas realizado usando el programa T-Coffee. En este caso, se muestran los resultados para las familias de precursores de los miARNs **A.** 172, **B.** 390, **C.** 393 y **D.** 403. Se indican las distintas regiones de los precursores (*F1*, *F2*, *F3*, *m* y *m**). Los recuadros en color gris indican bases con una alta frecuencia de conservación para dichas posiciones.

I. I. J. Familia del miR403

Entre los miARN estudiados, el miR403 es el único caso considerado un miARN evolutivamente joven. Los miARNs jóvenes generalmente se expresan a niveles bajos y, por lo tanto, son difíciles de detectar (Rajagopalan *et al.* 2006; Fahlgren *et al.* 2007, 2010; Addo-Quaye *et al.* 2008). Xu y colaboradores (2013) habían identificado un único precursor de este miARN en *C. sinensis*, pre-miR403a, pero

años más tarde, se informó la presencia de un segundo integrante para la familia (Taylor *et al.*, 2017). El reporte de Taylor identificó al nuevo precursor como el pre-miR403a y al existente como el pre-miR403b. Actualmente se informan de esa manera en miRBase. Ambos precursores presentan una región *F1* de 13 nt, *m* y *m** de 21 nt, y una región *F2* de 10 nt, pero se diferencian en la longitud del bucle terminal, siendo de 65 nt para el *a* y 43 nt para el *b*.

La secuencia consenso obtenida indica que no hay una gran divergencia en las regiones compartidas entre los precursores, lo cual se corresponde el surgimiento más reciente en la evolución de esta familia. El tamaño y la baja conservación de la región *F3* no se correspondería con el esperado para un procesamiento del tipo *loop to base*, por lo que se podría inferir un procesamiento desde la base al bucle, pese a tener regiones *F1* y *F2* cortas (Figura 15. D).

I. II. Análisis de la conservación de secuencia de los miARNs maduros funcionales

Como se mencionó anteriormente, los miARN llevan a cabo su función por complementariedad de bases, por lo que ciertas regiones no pueden alterarse. Las regiones 5' de los miARNs son reconocidas por las proteínas AGO presentes en los complejos RISC y por lo tanto deben conservarse. A su vez, apareamientos perfectos del nucleótido 2 al 7-8 dentro del 5' del miARN maduro (región "semilla") son muy importantes para el reconocimiento del *target* (Lewis *et al.*, 2003; Pandey *et al.*, 2019). Además, se ha reportado la necesidad de que no existan más de 3 desapareamientos consecutivos entre el miARN maduro y la secuencia del transcripto a silenciar para que el mismo sea funcional. Las posiciones 10 y 11 generalmente son reconocidas por AGO para realizar el corte del *target*, por lo que se espera que también sean conservadas (Schwab *et al.*, 2005), aunque ha sido reportado que la posición 11 excepcionalmente puede variar (Boutla *et al.*, 2001; Elbashir *et al.*, 2001; Holen *et al.*, 2002). También se han reportado casos en donde el miARN presenta una alta complementariedad en ambos extremos y desapareamientos en la región central (Axtell, 2013). Sumado a ello, se ha reportado el caso del miR396 de *A. thaliana* como un miARN conservado cuya fuerza de regulación se ve modificada dependiendo de

la complementariedad de bases respecto del *target*, la cual presenta un bucle en las posiciones 7 y 8 (Debernardi *et al.*, 2012). Este bucle, le permite generar patrones de regulación espacio-temporales esenciales para la planta.

Teniendo en cuenta estas características, se procedió a alinear las secuencias de los miARNs maduros estudiados. Siguiendo el procedimiento que se usó con los precursores, se obtuvieron las secuencias consenso para cada familia (Figura 16). Se observó que para 7 de las 10 familias analizadas, las posiciones del nucleótido 2 al 8 no presentaron modificaciones (miR164, 167, 169, 172, 390, 393 y 403). Esta es una característica esperada por la importancia de esta región semilla en el reconocimiento de los genes *targets*, comúnmente utilizada en herramientas bioinformáticas de búsqueda o predicción (Jones-Rhoades y Bartel, 2004; Chorostecki *et al.*, 2012).

Dentro de las 3 familias que presentaron modificaciones en la región semilla, el miR166 consenso presentó una única variación en la posición 2, en donde un grupo de la familia (mirR166*h*, *i* y *j*) cambió la C₂ característica por una T₂ en dicha posición. Dentro de la familia del miR171, solamente el miR171b fue quien mostró la variación en la posición 2 reemplazando una C₂ por la T₂ presente en el resto de los integrantes. El miR156, por su parte, mostró una variación en la posición 5 solo para el caso del miR156g. Por lo tanto, de este análisis se desprende que la región “semilla” de los miARNs analizados en este trabajo muestra conservación de secuencia, acorde a lo planteado por Lewis y colaboradores (2003).

En cuanto a las posiciones 10 y 11, necesarias para el reconocimiento y corte por parte de la proteína AGO, vemos que solamente para el caso del miR156 y miR171 existen cambios, por lo que la conservación también está dada en esta región. En la familia del 156, tres de los siete precursores poseen cambiada una G₁₁ por una T₁₁. Por su parte, en la familia del miR171 la variación es mayor, presentando cambios en los dos nucleótidos. La posición 10 fue la más conservada de ambas, con solo un reemplazo por parte del miR171*b*, introduciendo una A₁₀ en lugar de G₁₀. En la posición 11, por el contrario, tres de los precursores presentan cambiada la C₁₁ por una T₁₁.

Para todos los casos estudiados, el tamaño de la secuencia del miARN y miARN* fue el mismo, con excepción del miR393. En dicho caso, el tamaño del miARN funcional fue de 22 nt, mientras que el miARN* fue de 21 nt, lo cual genera la formación de un dúplex miARN/miARN* asimétrico. Esta característica particular del miR393 se ha reportado también en plantas de *A. thaliana* (Manavella *et al.*, 2012b). En dicho trabajo, se ha demostrado que un dúplex miARN/miARN* asimétrico permite la generación de tasiARNs, en un fenómeno denominado transitivity. Esta característica puede desencadenar el silenciamiento de más genes *target* a partir de los tasiARNs generados (Allen *et al.*, 2005; Yoshikawa *et al.*, 2005). Por su parte, las variaciones encontradas sobre las familias del miR156 y miR171, podrían estar relacionadas con variaciones en las secuencias de los genes *targets* asociados, presentando una adaptación regulatoria.

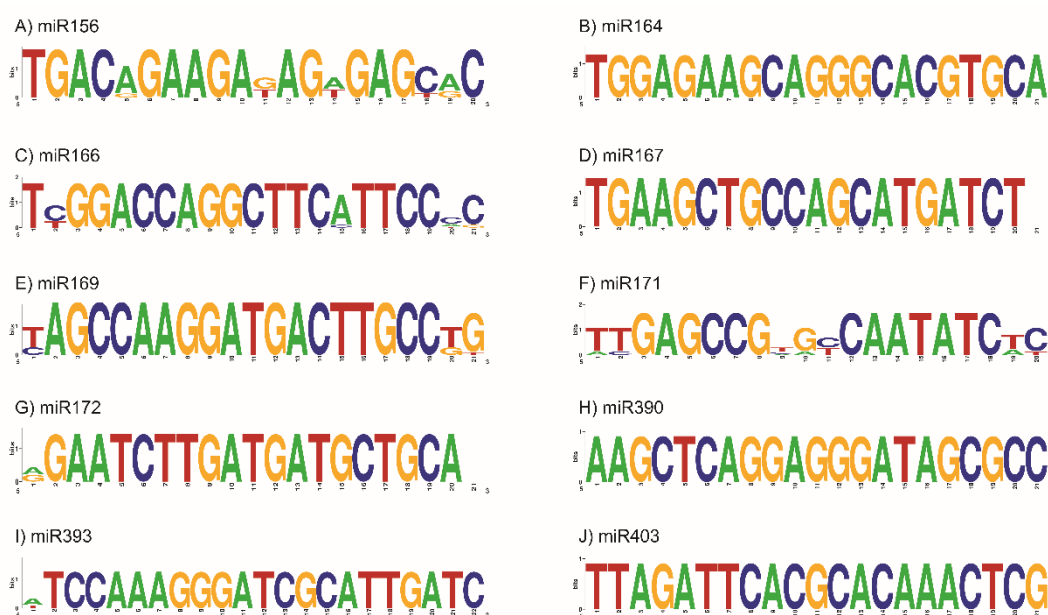


Figura 16: Logotipos para las secuencias de miARNs maduros estudiadas de *C. sinensis*. Los logotipos representan la secuencia funcional consenso para las familias de miARNs A. 156, B. 164, C. 166, D. 167, E. 169, F. 171, G. 172, H. 390, I. 393 y J. 403. El alineamiento previo, fue realizado usando el programa T-Coffee.

I. III. Determinación del mecanismo de procesamiento de precursores basado en la estructura secundaria

Con la intención de caracterizar los mecanismos de procesamiento de los precursores de miARN de *C. sinensis* estudiados, se realizó un modelado bioinformático mediante la utilización del programa Mfold (Zuker, 2003) de manera de obtener las diferentes estructuras secundarias que incluyen los tallos y bucles característicos (Ver Anexo II *online*: <https://drive.google.com/open?id=1TvGpvMDoP77E2gadlekqb5mpwUrog07x>) (Bologna *et al.*, 2013b; Chorostecki *et al.*, 2017; Moro *et al.*, 2018). Mediante comparación con los patrones de procesamiento de precursores ya obtenidos para plantas modelos (Bologna *et al.*, 2013b; Liu *et al.*, 2012; Chorostecki *et al.*, 2017; Moro *et al.*, 2018) y la identificación de determinantes estructurales, se predijo un modelo tentativo de procesamiento para estas familias.

El análisis se abordó mediante dos estrategias, por un lado, se analizó la frecuencia de apareamiento para cada una de las posiciones de los precursores individuales, se calculó el promedio y, el mismo, se graficó para todas las familias estudiadas (Figuras 17-21). Para ello, se fijó como posición “cero” al nucleótido 5' del miARN maduro; se les dio sentido negativo a las posiciones ubicadas hacia el 5' y positivo hacia el extremo 3'. Se analizaron las posiciones desde el centro del bucle terminal hasta el extremo de la hebra del precursor que contiene al maduro. Los apareamientos en cada posición se consideraron como 0, mientras que los desapareamientos fueron considerados como 1. Por otro lado, se hizo un alineamiento de los integrantes de cada familia y, a partir de éste, se obtuvo una estructura secundaria consenso utilizando la aplicación RNAalifold (versión 2.4.13, <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAalifold.cgi>; Lorenz *et al.*, 2011).

I. III. A. Familia del miR156

Para el caso de la familia del miR156, detectamos una región de conservación sobre el extremo del bucle terminal de ~42 nt característica del procesamiento *loop to base* (Figura 17. A). Este resultado, concuerda con los informes previos

sobre la familia del 156 de *A. thaliana* (Bologna *et al.*, 2013b; Chorostecki *et al.*, 2017; Moro *et al.*, 2018). La biogénesis se daría entonces mediante dos cortes por parte de DCL1, liberando así el dúplex con el miARN maduro. Cabe mencionar que, dentro de esta familia, el pre-miR156c presentó una estructura secundaria con un bucle terminal ramificado diferenciándose de los demás integrantes. Por consecuencia, el determinante estructural antes nombrado para la familia no pudo ser detectado en este precursor. Si bien para el caso del pre-miR156c de *A. thaliana* se ha inferido un procesamiento en sentido *loop to base* (Bologna *et al.*, 2013b; Moro *et al.*, 2018), nuestro análisis no permite la identificación clara de su procesamiento.

I. III. B. Familia del miR164

Para el caso de la familia del miR164, en cambio, inferimos un procesamiento en sentido contrario al mencionado anteriormente, realizándose desde la base al bucle. Dentro de esta familia encontramos la presencia de un determinante estructural de ARNdh ~15-17 nt en el tallo (característicos del procesamiento *base to loop*) a partir del cual la maquinaria de procesamiento reconocería los precursores, y luego de dos cortes liberaría el dúplex miARN/miARN* (Figura 17. B). Similar a lo ocurrido en la familia del miR156, se encontró que la estructura secundaria obtenida por Mfold para el pre-miR164c presentaba una porción ramificada en su región *F3*, por lo que se requeriría de un análisis más profundo para dilucidar su procesamiento. Si bien se ha planteado un procesamiento en sentido *base to loop* en reiteradas ocasiones para este precursor en *A. thaliana* (Chorostecki *et al.*, 2017; Moro *et al.*, 2018), el análisis realizado por Bologna y colaboradores (2013b) había detectado la presencia de determinantes estructurales relacionados con ambos tipos de procesamiento. Se genera entonces la inquietud de si el pre-miR164c sigue un mecanismo de procesamiento diferente al del resto de su familia en *C. sinensis*.

I. III. C. Familia del miR167

El análisis de los integrantes de la familia del miR167, también dio como resultado un procesamiento en dos cortes por parte de DCL1, caracterizado por la presencia de un tallo de ARNd_h de ~15 nt por debajo del dúplex maduro. La estructura secundaria consenso obtenida deja en evidencia una muy baja conservación sobre la región del bucle terminal, lo cual se refleja con la falta de bases apareadas sobre dicha región (Figura 17. C). Se propone entonces un mecanismo *base to loop*, lo cual se correlaciona con el propuesto en *A. thaliana* para esta familia (Bologna *et al.*, 2013b; Chorostecki *et al.*, 2017).

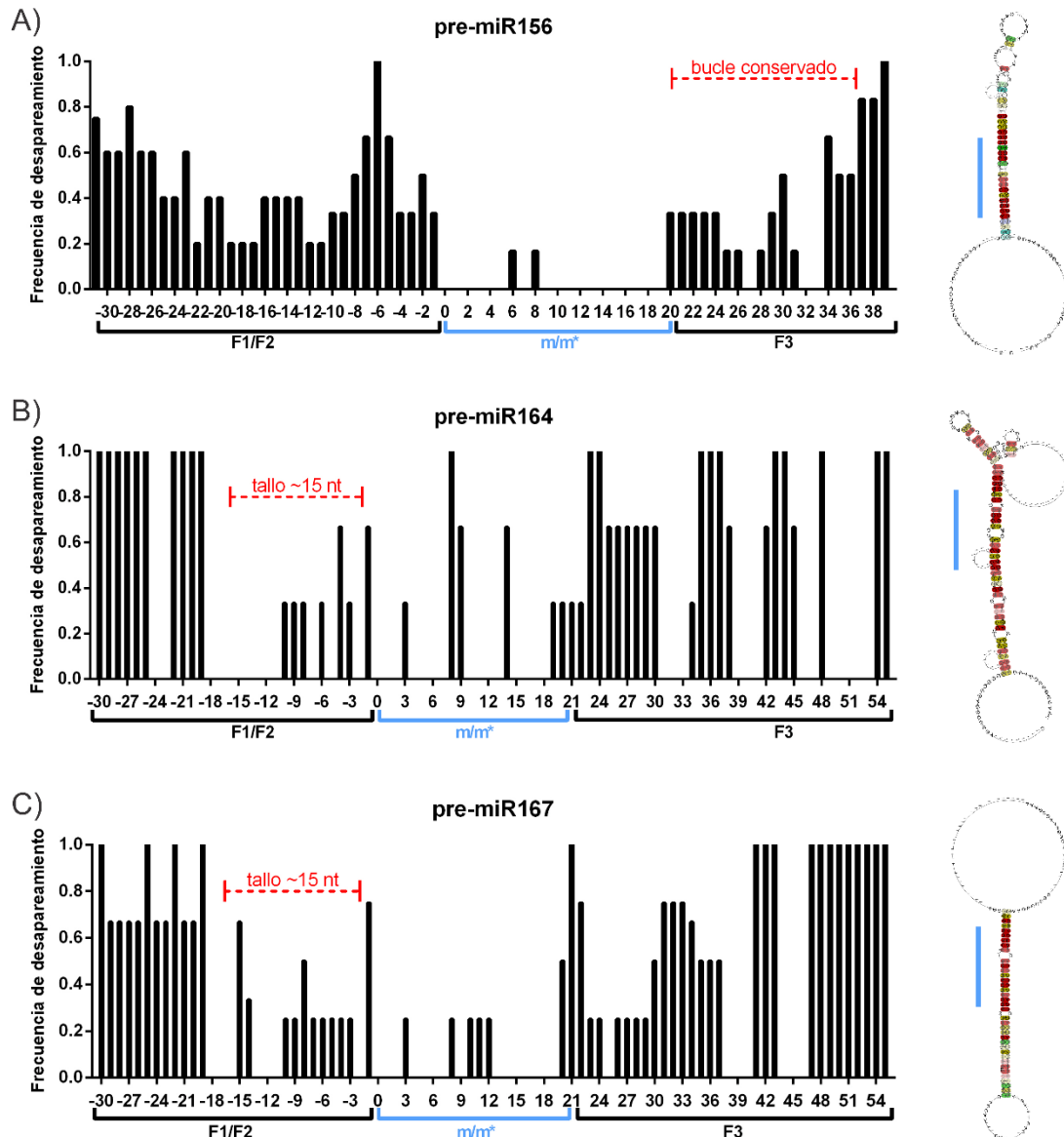


Figura 17: Estructura secundaria consenso y frecuencia de apareamiento de las familias de precursores de *C. sinensis*. Las estructuras secundarias se obtuvieron mediante Mfold (Zuker, 2003; <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/>). Para calcular las frecuencias se consideraron a los apareamientos en cada posición como 0, mientras que los desapareamientos fueron considerados como 1 y posteriormente se calculó el promedio para cada posición para cada familia. Se indican los resultados para: **A.** familia del pre-miR156; **B.** familia del pre-miR164; **C.** familia del pre-miR167. El determinante estructural reconocido por la maquinaria de procesamiento se indica en rojo sobre el gráfico de frecuencia. La estructura secundaria consenso obtenida con RNAalifold para cada familia se indica a la derecha. La barra celeste indica la posición del miARN/miARN* en la estructura.

I. III. D. Familia del miR166

Por su parte, se ha informado que la familia del miR166 de *A. thaliana* posee patrones alternativos en su estructura y que sus miembros no siguen un

procesamiento único (Bologna *et al.*, 2013b). Se sabe que varios integrantes de la familia son reconocidos por la maquinaria de procesamiento desde la región del tallo, pero a diferencia del determinante canónico, en este caso se reconoce una pequeña porción de ARNdh seguido de un gran bucle interno y una nueva región ARNdh (tallo-bucle-tallo: tallo señal) (Chorostecki *et al.*, 2017). Para el caso de los precursores de *C. sinensis*, de igual manera encontramos que esta familia presenta estructuras secundarias sumamente variables, lo que dificulta inferir un procesamiento global. Basándonos en dichas estructuras, hemos dividido la familia en 4 grupos: dos de ellos serían procesados en sentido *base to loop*, mientras que los otros dos se procesarían en sentido *loop to base*.

Entre los procesados en sentido *loop to base*, los precursores se dividieron en dos grupos: *a*, *g* e *i* presentaron un bucle terminal característico de ~42 nt estructurado, el cual permitiría un procesamiento en dos cortes por DCL1 (Figura 18. A); por su parte, los pre-miR166*b* y *e* cuentan con una región *F3* largamente estructurada, lo que permite inferir un procesamiento de tipo secuencial, requiriendo tres cortes por parte de DCL1 (Figura 18. B).

Dentro del grupo procesado en sentido *base to loop*, se encuentran los precursores *c*, *d*, *f*, *h* y *j*, de los cuales *d*, *h* y *j* presentaron un tallo característico de ~15nt ARNdh por debajo del m/m* (Figura 18. C). En cambio, los pre-miR166*c* y *f* presentaron el determinante estructural de tallo señal caracterizado por Chorostecki y colaboradores (2017; Figura 18. D). Independientemente del determinante que posean, este segundo grupo de la familia requeriría solamente dos cortes por parte del complejo de procesamiento para liberar el miARN maduro. Los pre-miR166*c* y pre-miR166*j* presentaron un bucle ramificado en su región *F3*, lo que podría indicar un procesamiento más complejo para ellos.

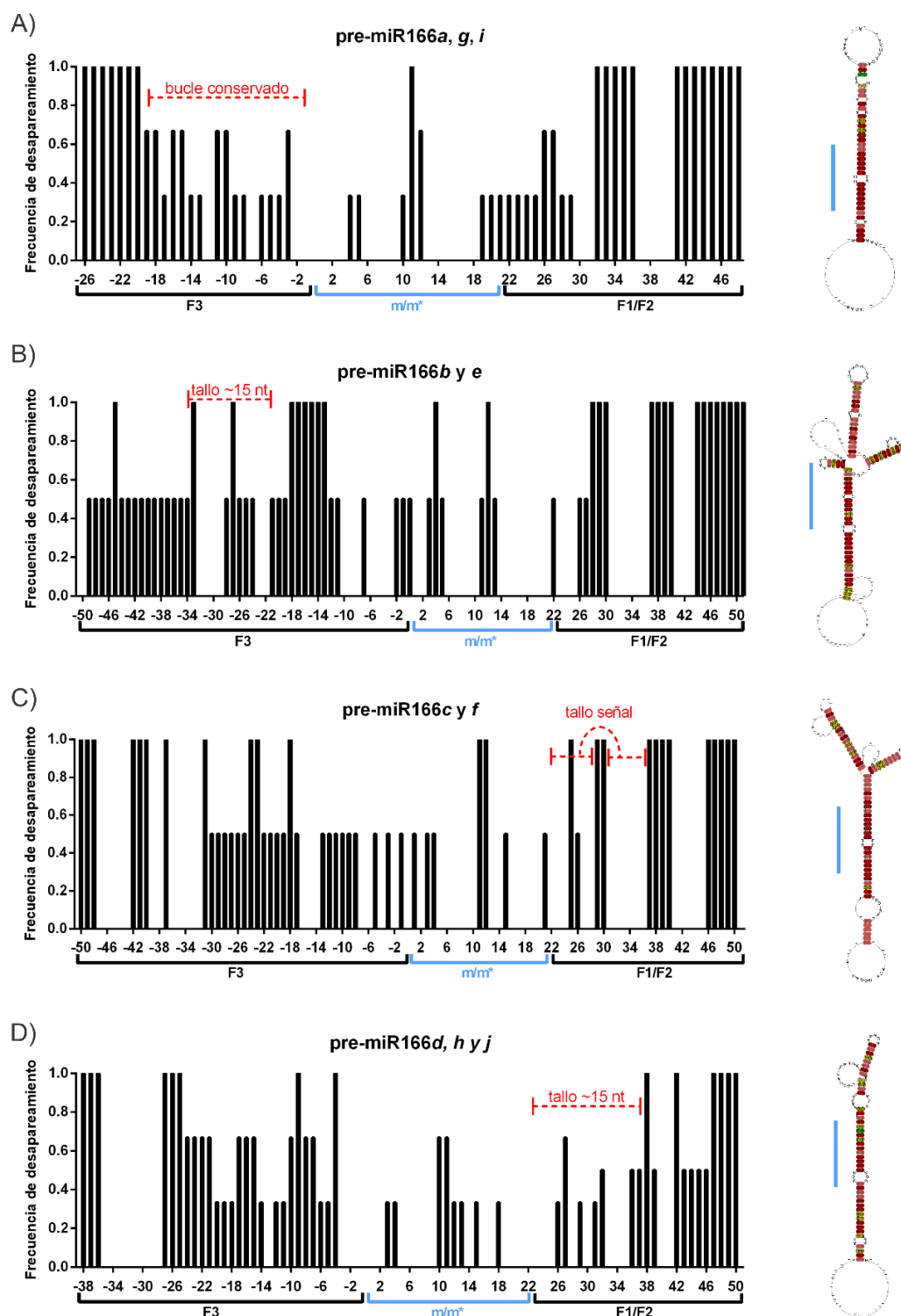


Figura 18: Frecuencia de apareamiento y estructura secundaria consenso para la familia del pre-miR166 de *C. sinensis*. Las estructuras secundarias se obtuvieron mediante Mfold (Zuker, 2003). Para calcular las frecuencias se consideraron a los apareamientos en cada posición como 0, mientras que los desapareamientos fueron considerados como 1 y posteriormente se calculó el promedio de cada posición para cada grupo: **A.** pre-miR166a, g e i; **B.** los pre-miR166b y e; **C.** los pre-miR166c y f; **D.** pre-miR166d, h y j. En este caso, la familia fue agrupada respecto a los determinantes estructurales encontrados, indicados en rojo sobre el gráfico de frecuencia.

La estructura secundaria consenso obtenida con RNAalifold para cada grupo se indica a la derecha. La barra celeste indica la posición del miARN/miARN* en la estructura.

I. III. E. Familia del miR169

Por su parte, dentro de la familia del miR169 de *A. thaliana* se ha informado la existencia de varios miembros cuyo procesamiento requiere más de dos cortes de forma secuencial por parte de la maquinaria de biogénesis (Bologna *et al.*, 2013b; Moro *et al.*, 2018). Esto se produce por la presencia de determinantes estructurales situados a una distancia de ~21 nt del *miR/miR**. Al analizar las estructuras secundarias de los precursores de *C. sinensis*, observamos que el comportamiento de 4 de los integrantes de la familia (precursores *a*, *d*, *h* y *j*) coincidía con el de la planta modelo ya que, los determinantes estructurales no

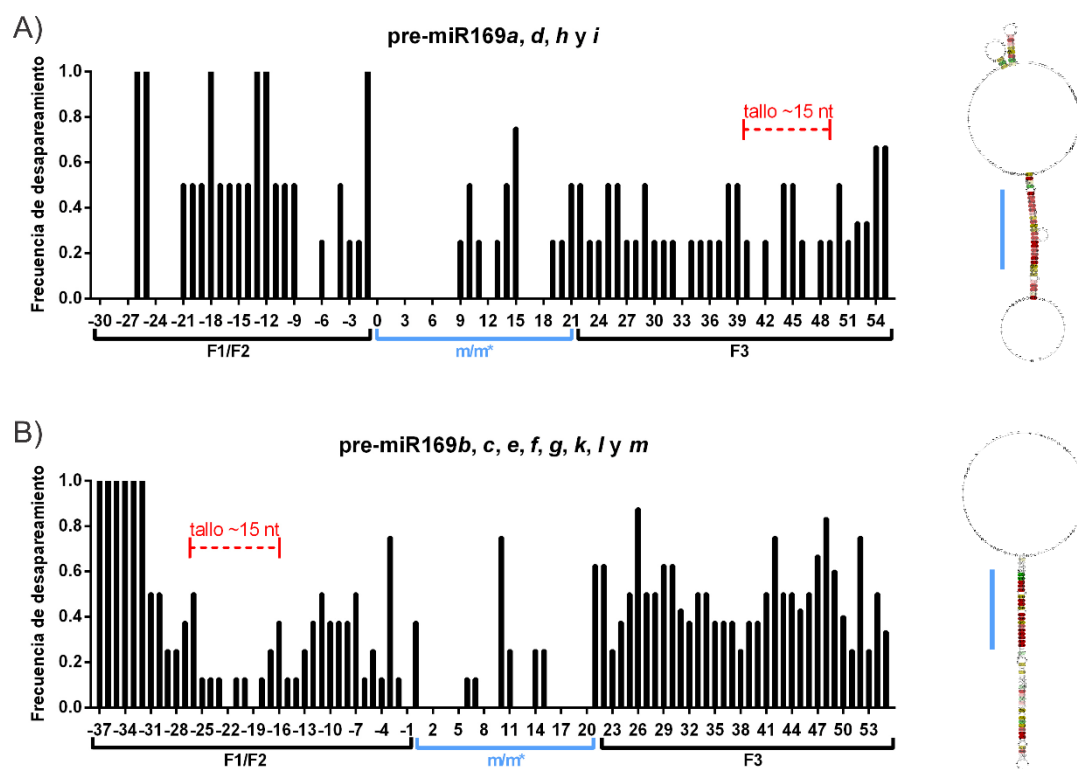


Figura 19: Frecuencia de apareamiento y estructura secundaria consenso para la familia del pre-miR169 de *C. sinensis*. Las estructuras secundarias se obtuvieron mediante Mfold (Zuker, 2003). Para calcular las frecuencias se consideraron a los apareamientos en cada posición como 0, mientras que los desapareamientos fueron considerados como 1 y posteriormente se calculó el promedio de cada posición para cada grupo: **A.** pre-miR169a, d, h e i; **B.** pre-miR169b, c, e, f, g, k, l y m. En este caso, la familia fue agrupada respecto a los determinantes estructurales encontrados, indicados en rojo sobre el gráfico de frecuencia. La estructura secundaria consenso obtenida con RNAalifold para cada grupo se indica a la derecha. La barra celeste indica la posición del miARN/miARN* en la estructura.

se encontraban junto a la región *m/m**, sino ~21 nt desplazados. La estructura secundaria consenso obtenida para este grupo en *C. sinensis* representa esta zona intermedia de ~21 nt con un gran bucle desestructurado, seguida de una porción con apareamientos hacia la región del bucle. Inferimos entonces, que el mecanismo de procesamiento seguido por este grupo sería en sentido *loop to base* y de manera secuencial, requiriendo tres cortes por parte de DCL1 (Figura 19. A). Un segundo grupo de pre-miR169 (*b, c, e, f, g, k, j y m*) presentaron un tallo de ~15 nt ARNdh, separado por unos ~21 nt de la región que contiene el miARN maduro. En este caso, el procesamiento se daría en sentido *base to loop* secuencial, requiriendo tres cortes para la liberación del miARN/miARN* (Figura 19. B).

I. III. F. Familia del miR171

El análisis de la familia del miR171 demostró que sus integrantes se dividen en dos grupos. Por un lado, los pre-miR171*a, c, d, f y g*, presentan un bucle terminal estructurado de ~42 nt, lo que permite pensar que los mismos serían procesados desde el bucle en sentido *loop to base* (Figura 20. A). Por otra parte, el resto de la familia (precursores *b, y e*), presentaron el tallo característico de ~15 nt ARNdh por debajo del dúplex *m/m** y una región *F3* con varios bucles internos. Por lo tanto, el mecanismo inferido para este segundo grupo, es del tipo *base to loop* (Figura 20. B). En ambos casos, se requerirían solo dos cortes por parte del complejo procesador para liberar el dúplex conteniendo el maduro. Para el caso de *A. thaliana* se ha informado un procesamiento en sentido *base to loop* para los precursores 171*a* y 171*b* y en sentido opuesto para el caso del pre-miR171*c* (Chorostecki *et al.*, 2017). Este resultado se contrapone a lo reportado anteriormente por Bologna *et al.* (2013b), donde se había propuesto que los precursores *b* y *c* contaban con determinantes indicativos de una biogénesis *loop to base*, mientras que el pre-miR171*a* se identificaba con un procesamiento *base to loop*. Pese a las discrepancias, los informes sobre la familia del miR171 en la planta modelo indican un procesamiento mixto dentro de la familia, hecho que se relaciona con lo encontrado para los precursores de *C. sinensis*.

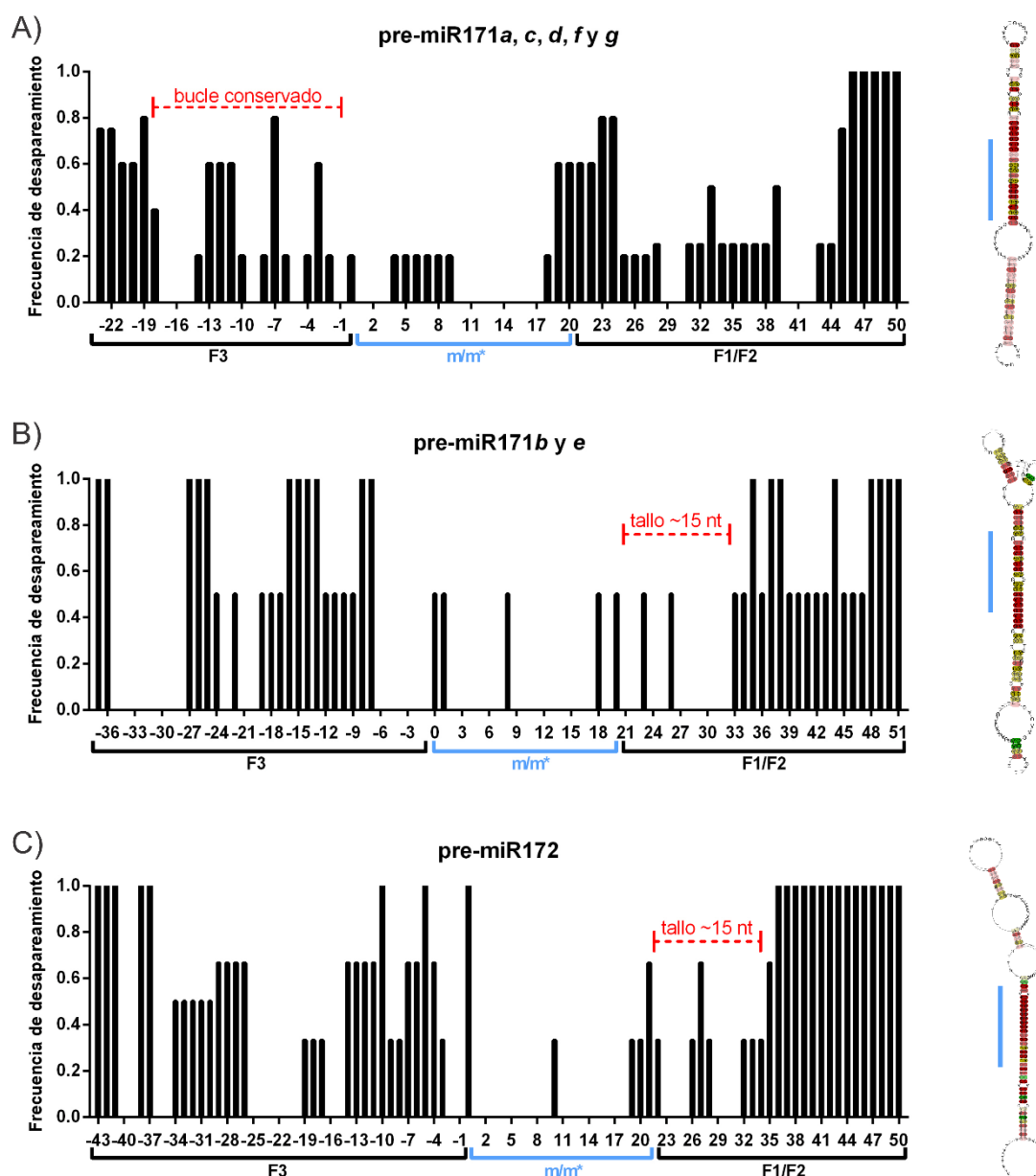


Figura 20: Estructura secundaria consenso y frecuencia de apareamiento para las familias de precursores de *C. sinensis*. Las estructuras secundarias se obtuvieron mediante Mfold (Zuker, 2003). Para calcular las frecuencias se consideraron a los apareamientos en cada posición como 0, mientras que los desapareamientos fueron considerados como 1 y posteriormente se calculó el promedio de cada posición para cada grupo: **A.** pre-miR171a, c, d, f y g; **B.** pre-miR171b y e. En este caso, la familia fue agrupada respecto a los determinantes estructurales encontrados, indicados en rojo sobre el gráfico de frecuencia; **C.** indica el resultado para la familia completa del miR172.

La estructura secundaria consenso obtenida con RNAalifold para cada grupo se indica a la derecha. La barra celeste indica la posición del miARN/miARN* en la estructura.

I. III. G. Familia del miR172, miR390, miR393 y miR403

El análisis estructural de las familias del miR172 (Figura 20. C), miR390, miR393 y miR403 (Figura 21. A-C, respectivamente) arrojó resultados similares para todas ellas. Las mismas, se vieron caracterizadas por la presencia de un tallo de ARNdh de ~15 nt comprendidas por las regiones *F1/F2*. Sobre la región del bucle terminal, presentaron varios bucles internos, lo cual se ve reflejado en la estructura secundaria consenso obtenida para cada familia. Si bien los dos precursores del miR403 presentaron regiones *F1* y *F2* cortas, demostraron estar formando ARNdh, permitiendo inferir un determinante estructural sobre el tallo lo cual se ve reflejado en la estructura consenso obtenida para esta familia.

Para las cuatro familias, los mecanismos propuestos son en sentido *base to loop* y son consistentes con los reportados en *A. thaliana* (Bologna *et al.*, 2013b; Chorostecki *et al.*, 2017; Moro *et al.*, 2018). La liberación del dúplex miARN/miARN* se producirá entonces, luego de dos cortes por parte del complejo procesador para todos estos casos.

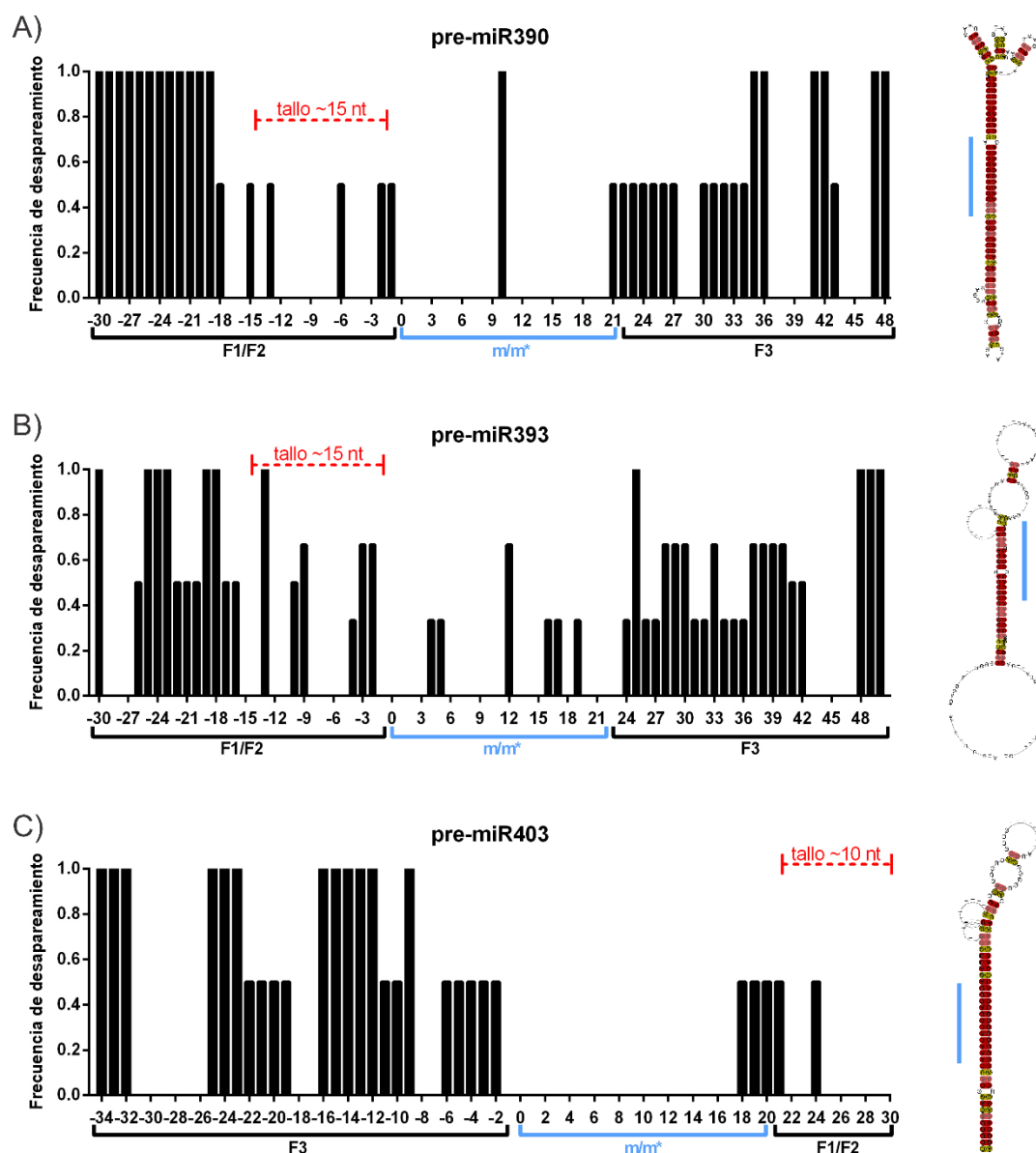


Figura 21: Estructura secundaria consenso y frecuencia de apareamiento de las familias de precursores de *C. sinensis*. Las estructuras secundarias se obtuvieron mediante Mfold (Zuker, 2003; <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/>). Para calcular las frecuencias se consideraron a los apareamientos en cada posición como 0, mientras que los desapareamientos fueron considerados como 1 y posteriormente se calculó el promedio para cada posición para cada familia. Se indican los resultados para: **A.** familia del miR390; **B.** familia del miR393; **C.** familia del miR403. El determinante estructural reconocido por la maquinaria de procesamiento se indica en rojo sobre el gráfico de frecuencia. La estructura secundaria consenso obtenida con RNAalifold para cada familia se indica a la derecha. La barra celeste indica la posición del miARN/miARN* en la estructura.

Discusión

En este capítulo se analizaron las familias de precursores de 10 miARNs de *C. sinensis*, en relación a su secuencia y estructura. Se compararon los determinantes estructurales encontrados con las respectivas familias de *A. thaliana* y se propusieron mecanismos de procesamiento para cada uno de ellos.

Los resultados de Chorostecki *et al.*, (2017) han demostrado mediante un análisis de 36 especies de plantas, que los integrantes dentro de una misma familia de pre-miARNs pueden presentar procesamientos muy variados, los cuales se conservan evolutivamente. En nuestro análisis, no hacemos referencia al comportamiento de secuencias a nivel de cada precursor como en dicho trabajo, sino que analizamos la conservación de la familia en su conjunto. La composición de secuencias de cada familia de pre-miARNs suele variar de forma marcada en las regiones menos identificadas con su procesamiento, es decir, *F1/F2* para el caso de procesamientos desde el bucle a la base, o *F3* en el caso de los procesados desde el tallo. A su vez, observamos que las familias compuestas por un número bajo de integrantes, presentaron mayor conservación de secuencia (familias del miR390, miR393 y miR403). Una de las posibles explicaciones de esta variabilidad puede estar asociada a la función y evolución que ha sufrido cada uno de los miARNs. El miR403, por ejemplo, representa un miARN evolutivamente joven, lo cual explicaría la baja variación en su secuencia.

A su vez observamos que, dentro de una familia, la región correspondiente al miARN maduro es la que mayor conservación presenta y que las posiciones comprendidas entre los nucleótidos 2-8, con relevancia en el reconocimiento del transcripto *target*, demostraron estar sumamente conservadas. Solo dos de las familias demostraron alteraciones en dicha región (familias del miR156 y miR171). En relación a esto, Debernardi *et al.* (2012), informaron que para el miR396 de *A. thaliana* existe una regulación en su capacidad de silenciamiento que viene dada por alteraciones en la secuencia del miARN maduro sobre las posiciones 7 y 8. Dichas alteraciones le permiten una regulación espacio-temporal indispensable para la planta. Podría especularse entonces, que las

familias del miR156 y miR171 de *C. sinensis* ejercen una regulación similar. Por otro lado, estos cambios pueden significar una adaptación, permitiendo que se regulen diferentes *targets* dentro de una misma familia.

Las metodologías utilizadas para el estudio de la estructura secundaria de precursores permitieron la identificación de determinantes estructurales, muchos de ellos previamente identificados por el análisis de secuencias. Esto nos permitió inferir el mecanismo de procesamiento por el cual los precursores de las 10 familias estudiadas liberarían el miARN maduro funcional. De los 55 precursores analizados dentro de estas familias, encontramos que, para solo 11 de ellos (3 miembros de las familias del miR171, 4 del miR166 y 4 del miR169) el mecanismo de procesamiento inferido no se corresponde con el propuesto para *A. thaliana* (Chorostecki *et al.*, 2017; Moro *et al.*, 2018). Pese a las discrepancias con estos informes, los resultados publicados previamente por Bologna *et al.* (2013b) obtenidos mediante la metodología de SPARE para *A. thaliana*, no habían permitido inferir procesamiento claro para varios de los integrantes de la familia del miR166. Además, para muchos de los pre-miR169 se había informado la existencia de determinantes estructurales relacionados con los dos sentidos de procesamiento. Cabe destacar, que muchos de los integrantes de la familia del miR169 de *C. sinensis* presentaron estructuras con bucles ramificados, lo que requeriría un análisis específico de cada uno de ellos para poder inferir si estas estructuras se relacionan con la degradación de los precursores o generan especies funcionales.

Por lo tanto, mediante las metodologías utilizadas para analizar los pre-miARNs en este capítulo, hemos inferido el tipo de procesamiento que seguirían en el 80% de los casos. Dentro del 20% restante, 8 de los 11 pre-miRNAs presentan discrepancias respecto a cómo se realizaría su biogénesis en *A. thaliana*, al igual que observamos en *C. sinensis*. Podemos concluir que el criterio utilizado en nuestro análisis se adapta de forma correcta con los datos evolutivos recolectados para distintas especies de plantas (Chorosteki *et al.*, 2017).



CAPÍTULO 2:

Estudio de la acumulación de pre-miARNs en muestras infectadas con CPsV y su interacción con proteínas virales.

Introducción

Como se detalló en la introducción, los miARNs de plantas se definen por su mecanismo de biogénesis único, el cual involucra el corte preciso a partir de su precursor plegado por parte de DCL1 (Bologna y Voinnet, 2014). A diferencia de lo que ocurre en animales, DCL1 posee la actividad catalítica para realizar todos los cortes necesarios para liberar el miARN maduro (Axtell *et al.*, 2011; Rogers y Chen, 2013; Bologna y Voinnet, 2014). Por ende, en plantas todos los cortes se producen en el núcleo y los intermediarios de procesamiento tienen una vida media corta, comparada con lo que sucede en animales, lo que dificulta su detección (Bologna *et al.*, 2009).

Pese a existir varios reportes en donde la infección por patógenos, como los virus, interfieren con la regulación mediada por miARNs a nivel post-transcripcional (Amin *et al.*, 2011; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2013), afectando la acumulación de especies maduras y actividad; un número bajo de esos informes reportan lo que ocurre con el procesamiento sus pre-miARNs (Naqvi *et al.*, 2010; Reyes *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2017). A su vez, en los reportes en donde se informa interacción de VSRs con ARNdh, la evaluación de las mismas se realiza generalmente por ensayos *in vitro* del tipo de retardo de movilidad en gel (EMSA), como ocurre por ejemplo con la proteína NS3 de RSV (Zheng *et al.*, 2017).

La inmunoprecipitación de ARN unido a proteínas (RIP, por *RNA immunoprecipitation*) es una técnica poderosa utilizada para detectar la asociación de proteínas individuales a moléculas de ARN específicos *in vivo*. La técnica involucra un simple paso de purificación por afinidad basado en la interacción específica entre un anticuerpo y su antígeno. Se ha empleado en numerosos reportes que estudian complejos de ribonucleoproteínas (RNP) en extractos de tejidos de plantas, la mayoría de ellos de *A. thaliana* (Terzi y Simpson, 2009; Barkan, 2009; Sorenson y Bailey-Serres, 2015). Aun así, existen pocos reportes de ensayos de RIP basados en la expresión transitoria de proteínas heterólogas con capacidad de unión a ARN como, por ejemplo, proteínas virales (Shen *et al.*, 2015).

Objetivos

A partir de la desregulación observada para el grupo de 7 miARNs en plantas de naranjo dulce infectadas con CPsV previo a la realización de esta tesis (Reyes *et al.*, 2016) decidimos evaluar la acumulación de sus respectivos pre-miARNs con la intención de caracterizar dicho efecto. De esta forma, poder inferir si el cambio observado se debe a un secuestro o desestabilización de los miARNs maduros, o a una alteración en el procesamiento de sus pre-miARNs.

Por otra parte, nos propusimos evaluar la posible interacción de las proteínas virales 24K^{CPsV} y 54K^{CPsV}, que presentan actividad VSR (Reyes *et al.*, 2016; Robles Luna *et al.*, 2017), con pre-miARNs en ensayos transitorios en plantas de *N. benthamiana*.

Resultados

II. Estudio de la acumulación de pre-miARNs en muestras infectadas con CPsV y su interacción con proteínas virales.

II. I. Cuantificación de pre-miARNs en plantas infectadas de naranjo dulce y su relación con la sintomatología

A partir de los datos publicados por Xu y colaboradores (2010 y 2013), se obtuvieron las secuencias de los pre-miARNs de *C. sinensis* estudiados y se identificaron los miembros que presentan mayor acumulación para cada una de estas familias (miR156a, miR167d, miR169d, miR171a, miR172a y miR393b). Con la intención de medir la acumulación de pre-miARNs en muestras de naranjo dulce, diseñamos cebadores que amplifican un único fragmento de los precursores de miR156a, miR167d, miR169d, miR171a, miR172a, miR393b y miR403 (Tabla 2, sección V.I.H de Materiales y Métodos). Se utilizaron también cebadores para amplificar el transcripto de ubiquitina, utilizado como control interno. El análisis de este tipo de moléculas suele resultar algo engorroso debido a la similitud de secuencias entre los integrantes de cada familia, como así también, a la estructuración que adoptan los mismos al plegarse y el alto grado de similitud dentro de un mismo precursor fundamentalmente entre la secuencia del miARN funcional y el miARN* (Bologna *et al.*, 2009). Se pusieron a punto ensayos de RT-qPCR para cuantificar la acumulación de pre-miARNs en plantas de *C. sinensis* inoculadas con los dos aislamientos de CPsV (90-1-1 y CPV-4) presentando la sintomatología característica y plantas sanas inoculadas con tejido sano (Figura 23).

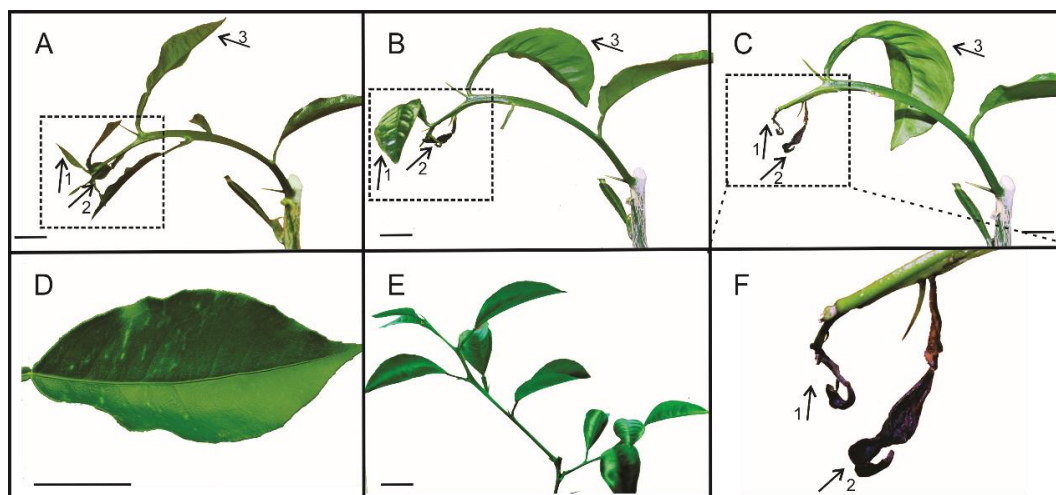


Figura 23: Sintomatologías observadas en plantas de naranjo infectadas con *Citrus sinensis* en invernáculo. **A-C.** brotes jóvenes mostrando la reacción de *shock* progresivo que provoca el curvamiento de las ramas y finalmente la necrosis de sus hojas. **D.** síntomas de *flecking* en los que se observan manchas cloróticas paralelas a las nervaduras; **E.** hojas sanas. **F.** Necrosis provocada por la sintomatología de *shock* en brotes jóvenes.

La cuantificación por RT-qPCR (Figuras 24 y 25) mostró un aumento de 1,4 veces el pre-miR156a respecto al control sano para las muestras con *flecking* 90-1-1 (F-90-1-1) y 1,35 veces para las muestras con *flecking* CPV-4 (F-CPV-4). Las muestras con la sintomatología de *shock* (S-90-1-1), mostraron un aumento de 1,48 veces los niveles del sano. Por su parte, el pre-miR167d alcanzó un aumento de 7,2 veces y 2,55 veces respecto al control negativo para las muestras F-90-1-1 y F-CPV-4, respectivamente. El incremento observado para la muestra S-90-1-1 fue mucho mayor, alcanzando un valor del 20 veces los niveles de las muestras sin infectar. Para el caso del pre-miR169d encontramos aumentos de 1,45 veces y 2,9 veces correspondientes a las muestras F-90-1-1 y F-CVP-4 respectivamente, mientras que el incremento alcanzó a 4,6 veces en las muestras S-90-1-1 respecto a la acumulación del control sano (Figura 24).

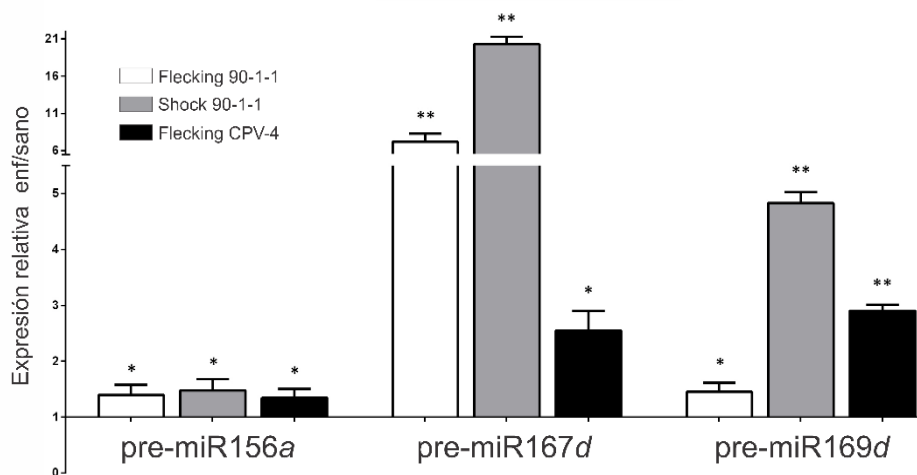


Figura 24: Análisis de acumulación relativa de pre-miARNs en plantas de naranjo dulce infectadas con dos aislamientos de CPsV. Mediante RT-qPCR se cuantificó la acumulación de transcritos para los pre-miR156a, pre-miR167d y pre-miR169d en plantas de naranjo dulce. Los gráficos indican niveles de expresión relativa respecto a las muestras sin infectar (Sano=1). * y ** indican diferencias significativas respecto al control sano con valores de $P < 0,05$ y $P < 0,01$ respectivamente, usando *t-test*.

El pre-miR171a mostro un comportamiento similar al observado para el caso del pre-miR156, en donde las dos muestras provenientes de infecciones con 90-1-1 (*flecking* y *shock*), tuvieron un aumento similar y superior al observado para *F*-CPV-4. Los niveles alcanzados de acumulación en estas muestras fueron de 3,34, 3,40 y 2,7 veces respectivamente respecto de la muestra sin infectar. Para el caso del pre-miR172a solo se obtuvieron diferencias significativas para las muestras S-90-1-1, con un aumento del precursor de 2,33 veces respecto del control sano. En análisis del pre-miR393b mostró los cambios más drásticos, alcanzando aumentos de 16,5 y 45,6 veces la acumulación del control sano para las muestras *F*-90-1-1 y *S*-90-1-1 respectivamente. A su vez, fue el único caso en donde los niveles alcanzados para las muestras infectadas con el aislamiento CPV-4 (75,1) superaron a los alcanzados por las muestras *S*-90-1-1 (Figura 25).

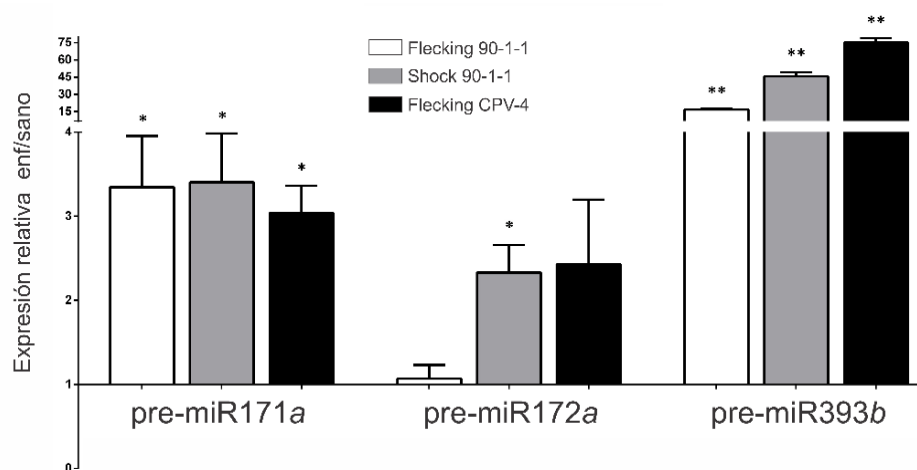


Figura 25: Análisis de acumulación relativa de pre-miARNs en plantas de naranjo dulce infectadas con dos aislamientos de CPVs. Mediante RT-qPCR se cuantificó la acumulación de transcritos para los pre-miR171a, pre-miR172a y pre-miR393b en plantas de naranjo dulce. Los gráficos indican niveles de expresión relativa respecto a las muestras sin infectar (Sano=1). * y ** indican diferencias significativas respecto al control sano con valores de $P < 0,05$ y $P < 0,01$ respectivamente, usando *t-test*.

Para el caso del pre-miR403 no pudimos poner a punto la PCR para obtener un único amplicón pese a haber diseñado varios pares de cebadores. Posterior a estos ensayos, Taylor y colaboradores (2017), reportó la existencia de un segundo integrante para la familia del miR403. En este caso, la secuencia identificada actualmente en miRBase como pre-miR403a representa el integrante nuevo de la familia, mientras que el pre-miR403b es coincidente con el publicado previamente por Xu y colaboradores (2010, 2013). Al realizar un alineamiento entre ellos, se observa que comparten gran parte de la secuencia. No es posible diseñar cebadores en regiones poco conservadas debido fundamentalmente a que el tamaño de los pre-miARNs es pequeño (Figura 26). Es probable entonces que los cebadores utilizados estén amplificando ambos pre-miARNs.



Figura 26: Alineamiento de los pre-miR403 de *C. sinensis* mediante *T-coffee*. El alineamiento de las secuencias muestra una alta conservación y un porcentaje de identidad superior al 60% (indicada con color rojo y asteriscos).

A partir de estos resultados, pudimos concluir que existe una acumulación aumentada de los pre-miARNs sin procesar para los seis analizados en *C. sinensis* en muestras infectadas respecto de muestras sanas. Este aumento, se correlaciona con la disminución de miARNs maduros informada por Reyes *et al.*, (2016). A su vez, pudimos observar una correlación entre la acumulación aumentada de pre-miARNs y la severidad de los síntomas, siendo las muestras con sintomatología de *shock* las que mayores cambios registraron respecto a las muestras sanas.

II. II. Ensayos de interacción de las proteínas virales con pre-miARNs en plantas de *N. benthamiana* mediante la metodología de RIP

II. II. A. Expresión transitoria e inmunoprecipitación de proteínas virales en plantas de *N. benthamiana*

La expresión transitoria mediante agroinfiltración es una metodología muy utilizada para la mayoría de los estudios de biología de plantas. En particular, en virología vegetal, se utiliza para la expresión de proteínas virales y el estudio de sus interacciones con proteínas celulares o con ácidos nucleicos.

Con el fin de ensayar la capacidad de interacción *in vivo* de las proteínas virales con pre-miARNs, se hicieron ensayos de agroinfiltración utilizando las proteínas 24K^{CPsV} o 54K^{CPsV} fusionadas a eGFP en plantas de *N. benthamiana*. Se utilizaron las construcciones pB7:54K^{CPsV}-eGFP y pB7:24K^{CPsV}-eGFP (Robles Luna *et al.*, 2013; Reyes *et al.*, 2016). A su vez, se co-infiltró con una mezcla de clones de *A. tumefaciens* que llevaban ambas proteínas virales para evaluar un posible efecto cooperativo entre ellas. Se utilizaron como controles negativos las proteínas eGFP y mRFP (Figuras 27 y 28). Todas las proteínas a ensayar se co-agroinfiltraron con el plásmido binario pBin61-p19 (Voinnet *et al.*, 2003) que porta la proteína supresora p19 de TBSV la cual, como se mencionó en la introducción, suprime el silenciamiento de los transgenes que estamos ensayando secuestrando sRNAs, pero no interfiere con los pre-miARNs (Vargason *et al.*, 2013; Csorba *et al.*, 2015; Li y Wang, 2019).

Se optimizó la metodología de RIP utilizando extractos de hojas agroinfiltradas con las construcciones mencionadas (Figura 27) (detalles de la metodología en la sección V.II.N. de Materiales y Métodos; Anexo: Marmisolle *et al.*, 2018).

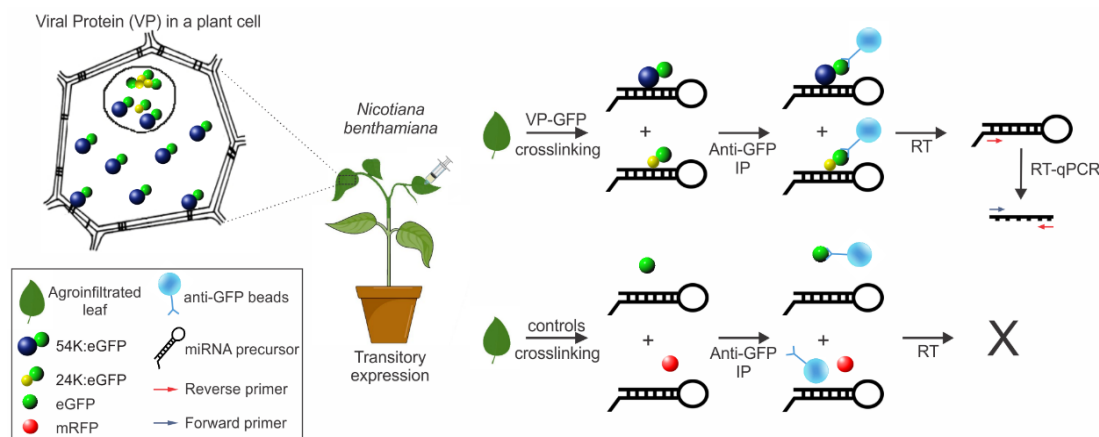


Figura 27: Representación esquemática de la metodología utilizada para el análisis de interacción de las proteínas virales 24K^{CPsV} y 54K^{CPsV} de CPsV con pre-miARNs en plantas de *N. benthamiana*. Se muestran las diferentes condiciones ensayadas: se evaluaron las proteínas virales 24K^{CPsV} (esfera amarilla) y 54K^{CPsV} (esfera azul) fusionadas a eGFP de forma individual o juntas. A su vez, se utilizaron las proteínas eGFP (esfera verde) y mRFP (esfera roja) como controles negativos. Luego de la inmunoprecipitación mediante el sistema GFP-Trap (representado en celeste) se cuantificaron los pre-miARNs mediante RT-qPCR. Tomado de Marmisolle *et al.*, (2018).

La expresión transitoria de las proteínas ensayadas se chequeó por microscopía bajo luz UV y alcanzó su máximo nivel a los 3 días post-agroinfiltración (dpa) (Figura 28. A-D). Se extrajeron proteínas totales y se comprobó la presencia e integridad de las proteínas virales mediante *Western blot* (Figura 28. E, INPUT) para posteriormente realizar el ensayo de RIP utilizando el sistema GFP-Trap (Chromotek). A partir de este sistema, se purificaron ambas fusiones virales a eGFP como así también al control eGFP libre. La proteína mRFP fue usada como un segundo control negativo (proteína que no se une a las *beads*). A partir de las muestras IP (Figura 28. E), se realizaron extracciones de proteínas y, por otra parte, se extrajo el ARN total. Mediante ensayos de *Western blot* se pudo comprobar que las proteínas virales estaban presentes en el inmunoprecipitado y que las mismas mantienen su integridad al aplicar el protocolo utilizado (Figura 28. E).

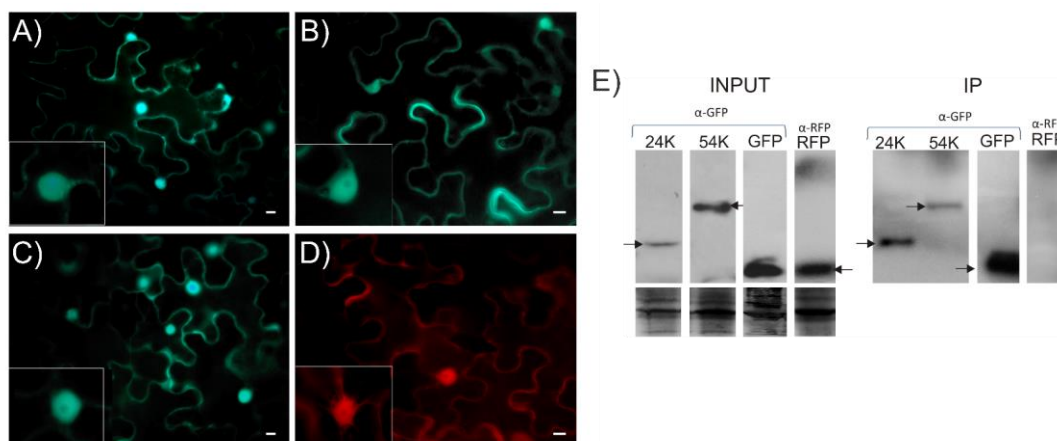


Figura 28: Expresión transitoria de las proteínas 24K y 54K de CPsV, GFP y RFP utilizadas para ensayos de RIP en plantas de *N. benthamiana*. Microscopías de fluorescencia de las proteínas virales 24K (A) y 54K (B) y de los controles GFP (C) y RFP (D) libres. Se observa la localización citoplasmática y nuclear de las proteínas a 3 dpa en células de la epidermis de *N. benthamiana*. Para el caso de 24K se observa, además, su localización nucleolar (nucleolos completamente llenos). Los recuadros (debajo, izquierda) muestran en detalle la localización nuclear. Barra de escala: 10 μm.

(E) Análisis mediante *Western blot* de la expresión transitoria de las proteínas 24K y 54K en plantas de *N. benthamiana* antes (*input*) y después (*IP*) de la inmunoprecipitación. Se muestran también los controles GFP y RFP en ambos casos. Ambas fracciones fueron analizadas usando anticuerpos anti-GFP (α-GFP) y anti-RFP (α-RFP). El panel inferior indica la tinción con *Coomassie blue* del gel de las muestras *input* como control de carga. Tomado de Marmisolle *et al.*, 2018.

II. II. B. Evaluación del enriquecimiento de pre-miARNs en muestras de *N. benthamiana* que sobreexpresan las proteínas virales

A partir de los extractos de ARN total de las muestras INPUT e IP obtenidos en el ensayo de RIP, se generó ADNc utilizando cebadores específicos para los pre-miR156a y pre-miR171a de *N. benthamiana*. Se siguió el mismo procedimiento con cebadores específicos para ubiquitina, como control interno. El ADNc obtenido se utilizó posteriormente como molde para la cuantificación mediante PCR en tiempo real (qPCR) de manera de poder analizar si existe enriquecimiento de los pre-miARNs evaluados en las muestras inmunoprecipitadas para el caso de las proteínas 24K^{CPsV}, 54K^{CPsV} (o ambas) respecto a los controles negativos mRFP o eGFP.

Para analizar los niveles de enriquecimiento de las diferentes muestras se utilizó el cálculo planteado por Keene y colaboradores, (2006). Brevemente, el factor de enriquecimiento (*Fold Enrichment*) del pre-miARN en cuestión en los inmunoprecipitados se calculó comparando la cantidad de ARN_{IP} frente al

ARN_{INPUT} (ΔC_t) para cada muestra, corregido a su vez, por el factor de dilución de las mismas. El valor obtenido para cada una de las proteínas virales (24K^{CPsV}, 54K^{CPsV}) y del control negativo mRFP en los inmunoprecipitados se relativizó posteriormente con el de GFP no fusionada. A continuación, se detallan los cálculos realizados.

- i. Se normaliza cada valor de C_t de las muestras de ARN_{IP} con sus respectivos *inputs* (ΔC_t) corridos en un mismo ensayo de qPCR (de esta manera se corrigen diferencias de preparación de las muestras de ARN).

$$\Delta C_t [\text{RIP normalizado}] = (C_{tIP} - C_{tINPUT}) - \text{Log}_2 (\text{FD})$$

FD: factor de dilución entre ARN_{INPUT} y ARN_{IP}.

- ii. Se ajusta el valor de ΔC_t [RIP normalizado] por el valor de C_t del *background*, que en nuestro caso es GFP libre.

$$\Delta \Delta C_t [\text{RIP/GFP}] = \Delta C_t [\text{RIP normalizado}] - \Delta C_t [\text{GFP normalizado}]$$

- iii. Se calcula el Factor de enriquecimiento (*Fold Enrichment*) por sobre el *background* (conversión lineal del $\Delta \Delta C_t$).

$$\text{Fold Enrichment} = 2^{-\Delta \Delta C_t [\text{RIP/GFP}]}$$

Como se puede observar en la Figura 29 A y B, la proteína 24K^{CPsV} presenta un enriquecimiento significativo de ambos pre-miARNs, alcanzando niveles de 4,5 veces para el pre-miR156a y 1,9 veces para el pre-miR171a respecto del control negativo mRFP. Para el caso de la proteína viral 54K^{CPsV} no se obtuvieron diferencias significativas de enriquecimiento con respecto al control negativo. En cambio, al evaluar la mezcla 24K^{CPsV}/54K^{CPsV} se observó un aumento significativo de 3,5 veces para el pre-miR156a y de 1,4 veces para el pre-miR171a respecto del control negativo mRFP. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas de enriquecimiento en ninguna de las muestras para el caso del control interno ubiquitina.

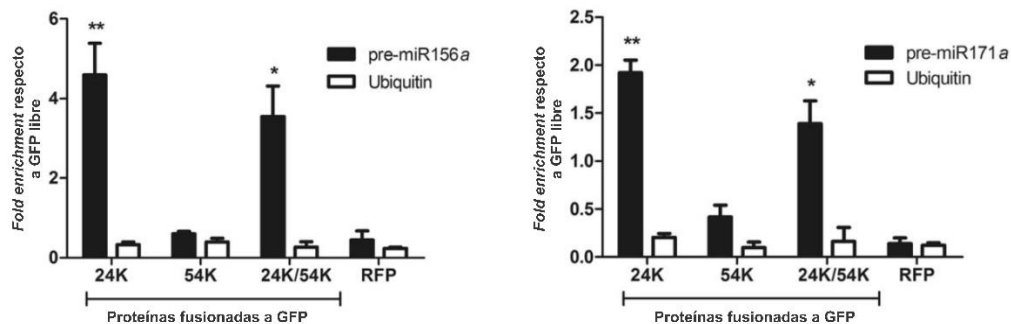


Figura 29: Análisis de RIP para pre-miARNs de *N. benthamiana* asociados a las proteínas virales de CPsV. Ensayos de RT-qPCR fueron llevados a cabo para determinar los niveles de expresión del pre-miR156a (A) y del pre-miR171a (B) en las muestras obtenidas a partir de ensayos de inmunoprecipitación. Los valores para las proteínas virales y el control negativo RFP se normalizaron con los obtenidos para la proteína GFP sin fusionar. Se muestran los resultados de tres experimentos independientes con sus desviaciones estándar. * y ** indican diferencias significativas respecto a la muestra RFP con $P < 0,05$ y $P < 0,01$ respectivamente, usando un *t-test*.

Estos resultados sugieren que la proteína 24K^{CPsV} interacciona directa o indirectamente con los pre-miARNs estudiados de *N. benthamiana*. Esta interacción podría afectar el procesamiento de miARNs y consecuentemente provocar las acumulaciones aumentadas de los pre-miARNs sin procesar observadas (sección II. I) y la reducción de miARNs maduros en *C. sinensis*.

Discusión

Muchos de los reportes que incluyen mecanismos de acción de VSRs involucran efectos sobre las especies maduras de miARNs, sin embargo, la biogénesis y el procesamiento de pre-miARNs también puede afectarse por la infección viral. Por ejemplo, Bazzini *et al.*, (2009) reportó alteraciones transcripcionales del miR164 de *A. thaliana* por infección de virus del mosaico de colza oleaginosa (ORMV). Por su parte, Lu y Cullen (2004), demostraron que el ARN VA1 de adenovirus, inhibe la biogénesis de miARNs al obstaculizar la exportación nuclear de los pre-miARNs y a su vez, interacciona con DCL1 inhibiendo su función. En este capítulo, se demostró que la acumulación de 6 pre-miARNs conservados en *C. sinensis* aumentan su acumulación en plantas infectadas con CPsV respecto de las muestras sin infectar y que estos cambios están relacionados con la severidad de los síntomas. Estos resultados, a su vez, se correlacionan con la reducción de las especies maduras reportadas previamente (Reyes *et al.*, 2016) y con el aumento de los transcriptos *targets* de estos miARNs que serán analizados en el Capítulo 3. Sumado a ello, Reyes y colaboradores analizaron la acumulación del transcripto primario para el caso del pre-miR156a en este tipo de muestras, sin observarse cambios significativos entre las muestras infectadas y sin infectar, descartándose al menos para este precursor, una regulación de tipo transcripcional.

A partir de estos resultados, pueden plantearse al menos dos mecanismos que conduzcan a las alteraciones en el procesamiento de miARNs por la infección viral: (i) por un lado, las proteínas virales pueden inhibir directamente componentes proteicos de la maquinaria de procesamiento mediante interacción con los mismos, y (ii) las proteínas virales pueden unir pre-miARNs e impedir su procesamiento. En relación al primer mecanismo, muchos reportes han indicado que la acumulación de especies maduras disminuye en mutantes deficientes en las proteínas accesorias HYL1 o SE, y dentro del grupo más alterado se encuentran los miR156, miR167 y miR171 (Grigg *et al.*, 2005; Lobbes *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012). Para las muestras de naranjo infectadas con CPsV, nuestros datos sumados a los reportados previamente por Reyes *et al.*, (2016) indican una clara alteración en la biogénesis del miR156, lo que podría

suponer una interacción de las proteínas virales de CPsV con alguna de estas proteínas accesorias durante la infección, limitando su función y por consiguiente afectando el procesamiento del miR156. Un comportamiento similar podría extenderse al resto de los pre-miARNs evaluados en este capítulo, que mostraron desregulación con la infección en muestras de *C. sinensis*. (Este primer mecanismo será abordado en el Capítulo 4). En relación a la segunda hipótesis, los ensayos de inmunoprecipitación mostrados en este capítulo revelaron una asociación entre la proteína 24K^{CPsV} y los pre-miR156a y pre-miR171a, sugiriendo una interacción de la proteína con estos pre-miARNs en el núcleo. Datos de nuestro laboratorio indican que tanto la 24K^{CPsV} como la 54K^{CPsV} pueden unir ARNdh largos sintéticos *in vitro* (Robles luna *et al.*, 2017), lo que también soporta la hipótesis de una interacción directa con los pre-miARNs que altere el procesamiento normal por parte de la maquinaria de biogénesis. Tampoco puede descartarse la alteración del procesamiento de miARNs provocado por las proteínas virales mediante ambos mecanismos.



CAPÍTULO 3:

Estudio de la acumulación de transcritos *targets* de miARNs y su relación con la sintomatología en plantas de *Citrus sinensis* infectadas con CPsV

Introducción

Los virus, a menudo interfieren con las vías de miARNs endógenas, lo que puede provocar síntomas de enfermedades, como clorosis, enanismo y crecimiento anormal (Bazzini *et al.* 2007; Du *et al.* 2011, Chen *et al.* 2012; Singh *et al.* 2012; Tong *et al.* 2017). Para evaluar y definir la función llevada a cabo por un miARN dentro de la planta, es necesario identificar el gen *target* sobre el que actúa. Estos genes pueden estar relacionados con diferentes procesos biológicos. Zhang y colaboradores (2012) han clasificado genes *targets* de miARNs de plantas de *Poncirus trifoliata* (naranja espinoso) en 11 categorías diferentes debido a su ontología génica. Entre los procesos metabólicos más representados se encontraron procesos celulares, respuesta a estímulos, procesos de desarrollo, etc., lo que sugiere que los miARNs de cítricos están involucrados en un amplio rango de funciones fisiológicas.

Por otra parte, varios estudios han identificado y validado *targets* conservados en cítricos, caracterizándolos como miembros de diferentes familias de factores de transcripción (FTs). Por ejemplo, los miR156 y miR172 regulan FTs de las familias *Squamosa promoter-binding protein-like* (SPL) y *Apetala2-like transcription factor* (AP2), respectivamente (Song *et al.*, 2010a, Song *et al.*, 2010b; Wu *et al.*, 2010), los cuales están implicados en la regulación del pasaje del estadio juvenil/adulto, respuesta a estrés abiótico, expresión de síntomas y defensa (Klein *et al.*, 1996; Cardon *et al.*, 1997, 1999; Padmanabhan *et al.*, 2013; Cui *et al.*, 2014). El miR167 se vio involucrado en la regulación de factores de respuesta a auxinas (ARFs, del inglés *auxin response factor*) (Zhang *et al.*, 2012). Sin embargo, muchos de los *targets* de miARNs de cítricos derivan de predicciones computacionales y aún no han sido validados.

Objetivos

Como se explicó en los capítulos anteriores, la infección viral producida por CPsV en plantas de naranjo dulce provoca una desregulación a nivel de los miARNs maduros y un aumento concomitante de sus precursores sin procesar. A su vez, un grupo pequeño de transcriptos *targets* evaluados anteriormente mostró relación inversamente proporcional respecto a los miARNs que los regulan (Reyes *et al.*, 2016).

Con la intención de caracterizar el grupo restante de genes *targets* correspondientes a los miARNs desregulados por CPsV, nos propusimos realizar una predicción bioinformática y validación mediante análisis de datos de degradoma ya publicados. A su vez, analizar experimentalmente su acumulación en muestras infectadas con dos aislamientos de CPsV y muestras sanas, buscando relacionar nuestros resultados con las diferentes sintomatologías y la severidad de los aislamientos utilizados.

Resultados

III. Estudio de la acumulación de transcriptos *targets* de miARNs y su relación con la sintomatología en plantas de *Citrus sinensis* infectadas con CPsV

III. I. Predicción bioinformática de los transcriptos *targets* de miARNs en *C. sinensis*

Como se detalló anteriormente, nuestro grupo realizó un análisis de acumulación de 10 miARNs conservados. Siete de ellos mostraron estar desregulados en al menos una de las muestras infectadas comparado con las muestras sanas. En dicho trabajo, también se analizó la acumulación de los *targets* validados *Squamosa promoter-binding protein-like* (SPL) 9 y 13, *Auxin response factor* (ARF) 6 y 8, y *Scarecrow-like 6* (SCL6) para los tres miARNs que presentaron mayor disminución (miR156, miR167 y miR171, respectivamente). Como se esperaba, se obtuvo una correlación negativa entre la acumulación de miARNs y sus *targets* en plantas infectadas respecto de las sanas (Reyes *et al.*, 2016).

Para evaluar la acumulación de los *targets* no validados para el grupo de los 4 miARNs restantes que también disminuyeron su acumulación por la infección con CPsV (miR169, miR172, miR393 y miR403), primeramente se realizó una predicción bioinformática mediante el uso de las plataformas comTAR (<http://rnabiochemistry.ibr-conicet.gov.ar/comtar/>; Chorostecki y Palatnik, 2014) y psRNATarget de PlantGRN (*A Plant Small RNA Target Analysis Server*; <http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>; Dai y Zhao, 2011). comTAR permite la predicción de *targets* usando una serie de miARNs conservados pre-cargados en el programa y al realizar la búsqueda tiene en cuenta la conservación evolutiva de ese *target* en diferentes especies. Mediante esta herramienta, obtuvimos potenciales *targets* para 3 de los 4 miARNs en cuestión: miR169, miR172 y miR393. Para el caso del miR403, fue necesaria la utilización de la herramienta psRNATarget, ya que permitía la búsqueda de transcriptos blancos para miARNs evolutivamente jóvenes, que no era posible mediante comTAR. Además, es

posible cargar la secuencia del miARN en cuestión y seleccionar la biblioteca (ADNc de *C. sinensis*) sobre la cual realizar la búsqueda.

De esta manera, se predijeron 10 posibles *targets* para los 4 miARNs analizados: *CCAAT-binding transcription factor* subunit B (*Nuclear factor Y*, subunidad A1 (CBFA1), subunidad A3 (CBFA3) y subunidad A10 (CBFA10), *targets* del miR169; *Ethylene-responsive transcription factor* (RAP2-7) e *Integrase-type DNA-binding superfamily protein* (AP2B), *targets* del miR172; *Transport inhibitor response 1* (TIR1) y *GRR1-like protein 1-related* (GRR1), *targets* del miR393; y finalmente, *Argonaute 2-related* (AGO2), *Argonaute 7* (AGO7) y un non-coding RNA (ncRNA), *targets* del miR403 (Figura 27).

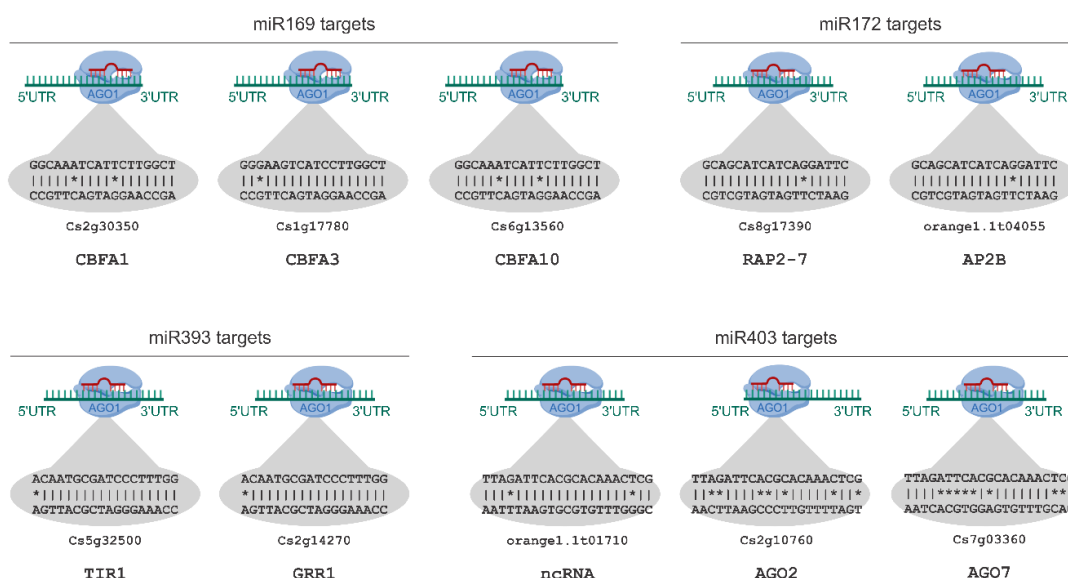


Figura 27: Genes *targets* predichos en *Citrus sinensis* y complementariedad miARN:target. En la figura se indican los alineamientos entre los *targets* y sus miARNs correspondientes dentro de las burbujas grises. Además, la posición de AGO1 (en azul) sobre ellos representa la localización predicha (3'UTR, CDS o 5'UTR) sobre la que pega el miARN (en rojo) en el *target* (en verde). Los ID correspondientes a cada uno de los *targets* se indica bajo la burbuja gris en cada caso.

Seguidamente, se asignaron las funciones para cada uno de los *targets* predichos mediante la herramienta *Gene Ontology* de Inter-ProScan (EMBL-EBI; <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>; Jones *et al.*, 2014, ver columnas GO en la Tabla 1). El análisis revela que CBFA, RAP2-7 y AP2B de *C. sinensis* funcionan como FTs con capacidad de unión específica a ADN; por su parte, TIR1 y GRR1 poseen sitios de unión a proteínas que actúan como receptores de auxinas. Para

el caso de las proteínas AGO, se encontraron los dominios PAZ, PIWI y el dominio tipo ribonucleasa-H característicos (Tabla 1).

Cada ARNm *target* posee tres regiones: un 3'UTR (por *untranslated region*), la región codificante (CDS, *coding sequence*) y un extremo 5'UTR. Un trabajo previo en cítricos, informó que el sitio de clivaje de miARNs se localiza generalmente sobre la región CDS de sus genes *targets* (Zhang *et al.*, 2012). En nuestro caso, los sitios de clivaje se localizaron en el 3'UTR para el caso de CBFA1, CBFA3 y CBFA10. Para el caso de AGO2 el sitio de corte se ubicó sobre el 5'UTR, mientras que para el resto de ellos se ubicó sobre la CDS. Solo dos *mismatches* se permitieron entre el miARN y la secuencia *target* para la predicción, con excepción de los casos de AGO2 y AGO7, para los cuales se permitieron siete y ocho *mismatches*, respectivamente (Figura 27). Estos dos últimos *targets* se obtuvieron por comparación de secuencia nucleotídica mediante la herramienta *Phytozome Blast* (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!search?show=BLAST>) con la proteína AGO2 de *A. thaliana*, la cual había sido previamente reportada como *target* del miR403 (Allen *et al.*, 2005). El porcentaje de similitud entre AGO2 y AGO7 de *C. sinensis* y AGO2 de *A. thaliana* fue relativamente alto. Es por ello que fueron permitidos más *mismatches* entre la secuencia del miARN y el *target*. Además, estudios recientes revelaron que la secuencia complementaria no es el único factor que dicta el modo de acción (clivaje o inhibición traduccional) de los miARNs de plantas (Hou *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2016).

III. II. Validación de *targets* mediante análisis de degradoma

Para validar los *targets* de miARNs predichos, se analizaron datos de secuencia de ARNm escindidos (degradoma) de *Citrus sinensis* (Liu *et al.*, 2014). Se realizó una búsqueda de los productos de degradación generados por los miARNs de interés sobre los *targets* predichos en bibliotecas de hoja de *C. sinensis* publicadas en dicho trabajo. Se utilizó el programa CleaveLand4 (Addo-Quaye *et al.*, 2009; Brousse *et al.*, 2014). Se seleccionaron solamente los productos de degradación que apareaban con los miARNs y presentaban un valor de $P < 0,05$

y categoría de degradoma de entre 0 y 2 para tener una aproximación más conservadora (sección V.II.T.2. Materiales y Métodos; Tabla 2 y Figura 28).

miRNA	ID Target	GENE SYMBOL	Degradome Category	Degradome P value	GO-InterproScan		
					Biological Process	Molecular Function	Cellular Component
csi-miR169	Cs2g30350	CBFA1	0	0.0111	regulation of transcription; DNA-templated	DNA-binding; DNA-binding transcription factor activity	CCAAT-binding factor complex
csi-miR169	Cs1g17780	CBFA3	0	0.0034	regulation of transcription; DNA-templated	DNA-binding; DNA-binding transcription factor activity	CCAAT-binding factor complex
csi-miR169	Cs6g13560	CBFA10	0	0.0011	regulation of transcription; DNA-templated	DNA-binding transcription factor activity	none predicted
csi-miR169	Cs4g05000	<i>Ubiquitin-associated /TS-N domain-containing protein</i>	0	0.0320	none predicted	protein binding	none predicted
csi-miR169	Cs7g01720	<i>Nuclear transcription factor Y subunit A-1; Transcriptional activator</i>	0	0.0015	regulation of transcription; DNA-templated	DNA-binding; DNA-binding transcription factor activity	CCAAT-binding factor complex
csi-miR172	Cs6g04120	<i>Floral homeotic protein APETALA 2; AP2-like</i>	2	0.0467	regulation of transcription; DNA-templated	DNA-binding; DNA-binding transcription factor activity	none predicted
csi-miR172	Cs7g27790	<i>Ethylene-responsive transcription factor RAP2-7</i>	0	0.0003	regulation of transcription; DNA-templated	DNA-binding; DNA-binding transcription factor activity	none predicted
csi-miR172	Cs8g17390	RAP2-7	0	0.0019	regulation of transcription, DNA-templated	DNA-binding; DNA-binding transcription factor activity	none predicted
csi-miR172	orange1.1t04055	AP2B	0	0.0011	regulation of transcription, DNA-templated	DNA-binding; DNA-binding transcription factor activity	none predicted
csi-miR393	Cs5g32500	TIR1 ^a	2	0.0468	none predicted	protein binding	none predicted
csi-miR403	Cs2g10770	AGO2	0	0.0019	none predicted	nucleic acid binding; protein binding	none predicted
csi-miR403	Cs4g19605	ncRNA	0	0.0073	none predicted	none predicted	none predicted
csi-miR393	Cs2g14270	GRR1*	none predicted	none predicted	none predicted	protein binding	none predicted
csi-miR403	orange1.1t01710	ncRNA*	none predicted	none predicted	none predicted	none predicted	none predicted
csi-miR403	Cs7g03360	AGO7*	none predicted	none predicted	none predicted	nucleic acid binding; protein binding	none predicted

Tabla 1: Resultados del análisis de degradoma para *Citrus sinensis* usando CleaveLand4.

En letras negritas se indican los datos obtenidos en el degradoma de hoja que coinciden con la predicción bioinformática. En letras sin resaltar se indican los *targets* adicionales obtenidos para los miARNs analizados con *score* aceptable.

* indica que el target predicho no se encontró en el degradoma de hoja.

^a indica que dicho *target* fue encontrado al analizar degradoma de fruta con buena calificación.

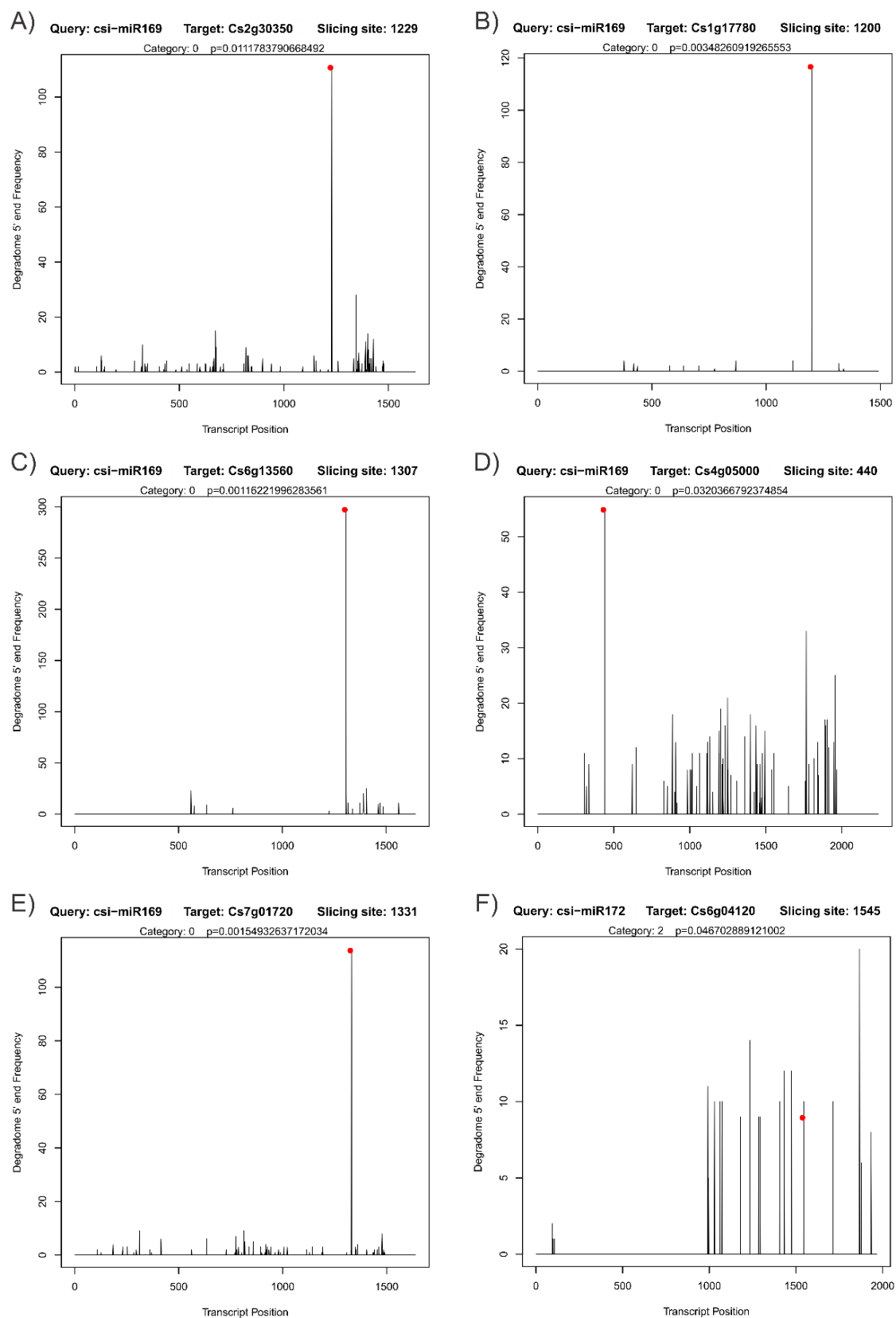


Figura 28: Diagrama de *target* (o *t-plot*) para los *targets* de miARNs validados en *C. sinensis* obtenidos mediante CleaveLand4. Continúa en la siguiente página.

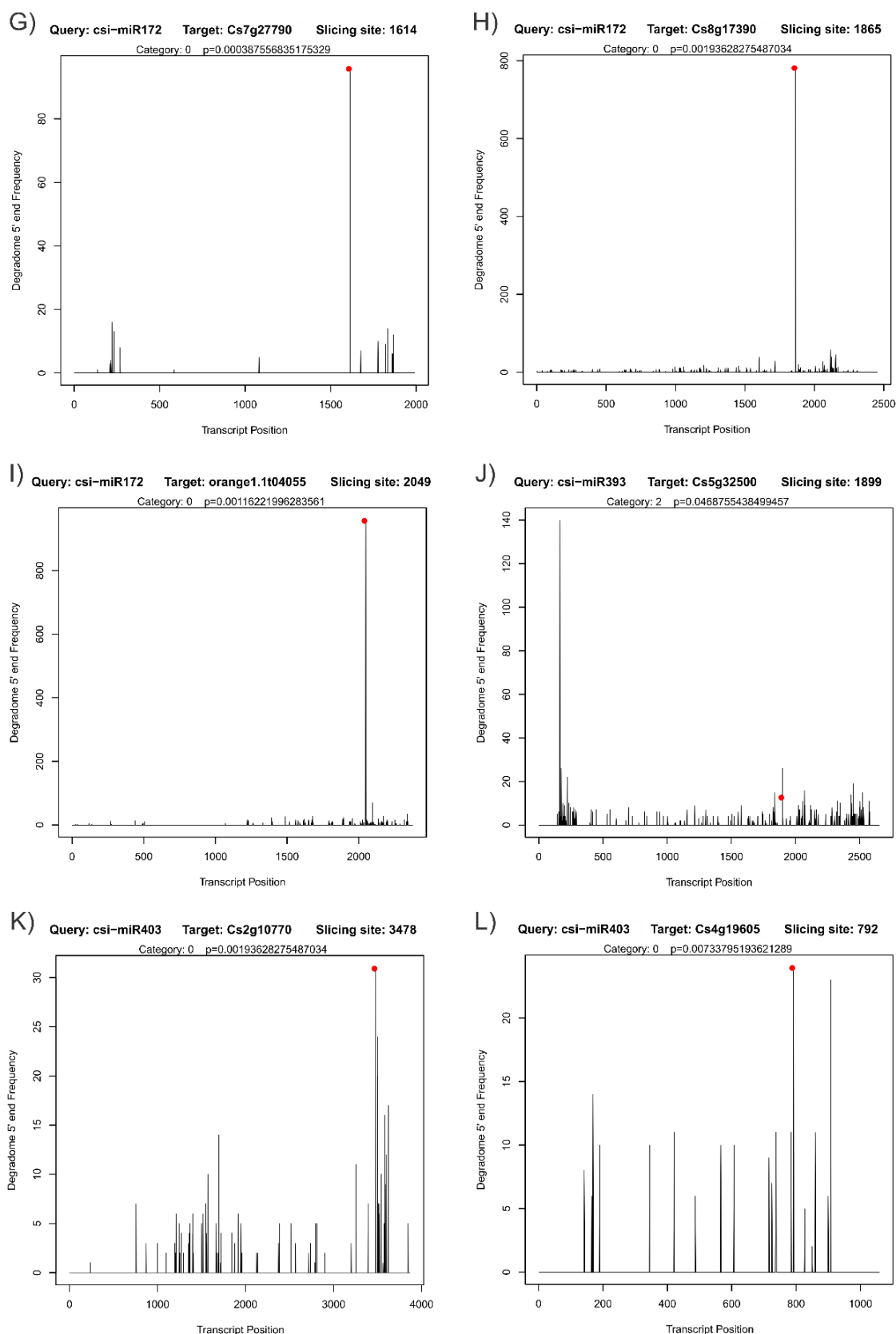


Figura 28: Diagrama de *target* (o *t-plot*) para los *targets* de miARNs validados en *C. sinensis* obtenidos mediante CleaveLand4. Leyenda en la siguiente página.

Figura 28: Diagrama de *target* (o *t-plot*) para los *targets* de miARNs validados en *C. sinensis* obtenidos mediante CleaveLand4. Los gráficos muestran los apilamientos de lecturas que alinean sobre cada transcripto evaluado y el sitio putativo de corte (punto rojo) que, si coincide con un apilamiento de lecturas alto, el programa lo considera como positivo. Los mismos se obtuvieron a partir de datos de degradoma de hoja (Liu *et al.*, 2014). **A-E)** *t-plots* obtenidos para los *targets* identificados con *score* aceptable para el miR169; **F-I)** *t-plots* obtenidos para los *targets* identificados con *score* aceptable para el miR172; **J)** *t-plots* obtenido para el *target* identificado con *score* aceptable para el miR393 (este único caso se obtuvo a partir de datos de degradoma de fruto); **K-L)** *t-plots* obtenidos para los *targets* identificados con *score* aceptable para el miR403. 'Query' corresponde al miARN utilizado para la búsqueda; 'Target' indica el número ID del transcripto blanco que se ha detectado; 'Category' se refiere a la categoría de degradoma asignado (utilizamos de 0-2 para ser más estrictos); 'P' hace referencia al valor estadístico P, (siempre menor a 0,05).

A partir de este análisis se detectaron los *targets* CBFA3, CBFA1 y CBFA10 anteriormente predichos para el miR169. Además, se encontró otro miembro de la familia de FTs CBFA (ID: Cs7g01720) como blanco del miR169. Para el caso del miR172 se detectaron los productos de degradación correspondientes a los *targets* RAP2-7 y AP2B anteriormente predichos y, dos *targets* adicionales pertenecientes a la familia *AP2-like* de respuesta a etileno. A su vez, mediante este análisis pudimos validar a AGO2 como *target* del miR403. Sin embargo, ninguno de los *targets* putativos para el miR393 (TIR1 y GRR1), como así tampoco el ncRNA (*target* predicho para el miR403), pudieron ser validados usando los datos de degradoma de hoja. No obstante, TIR1 fue identificado al analizar datos de degradoma de fruta provenientes del mismo trabajo (Liu *et al.*, 2014) como *target* del miR393, pero con un valor $P = 0,047$ y una categoría de 2.

III. III. Análisis de expresión de los *targets* de miARNs y su correlación con los síntomas

Para analizar si los *targets* en cuestión, validados y/o predichos, son alterados en su expresión por la infección con CPsV y evaluar si existe alguna correlación con la severidad de los síntomas, se infectaron plantas de naranjo dulce con los dos aislamientos de CPsV (90-1-1 argentino y CPV-4 de Estados Unidos). Se tomaron muestras de hojas que presentaban los síntomas foliares de *flecking* (manchas cloróticas causadas por ambos aislamientos); Figura 29. A) así como reacción de *shock*, (marchitamiento y necrosis en brotes jóvenes, producida solo por 90-1-1; Figura 29. B). Además, se recogieron muestras de plantas del mismo

estadio de desarrollo que habían sido inoculadas con material sano. Se diseñaron cebadores para analizar los siguientes *targets*: CBFA1, CBFA3, CBFA10, AP2, RAP2-7, TIR1, GRR1, AGO2, AGO7 y el ncRNA predicho (Tabla 4, sección V.I.H Materiales y Métodos). A partir de las muestras obtenidas, se realizaron PCRs en tiempo real (RT-qPCR) para analizar la acumulación de estos ARNm, usando a su vez, los transcriptos de actina y ubiquitina de *C. sinensis* como controles internos (Figura 29. C).

A partir de la cuantificación por RT-qPCR observamos que CBFA1 mostró un aumento de expresión de 1,27 veces en muestras con *flecking* de CPsV 90-1-1 (de ahora en más F-90-1-1) respecto de las muestras sanas utilizadas como control. Para el caso de las muestras con síntoma de *shock* para el mismo aislamiento (S-90-1-1) se vio un incremento de 2 veces respecto al control. Incrementos similares se observaron para el caso de CBFA3, en donde alcanzó un aumento de 1,55 veces para el caso de F-90-1-1 y 2,1 veces para el caso de S-90-1-1. El comportamiento de CBFA10 fue comparable al observado para el caso de CBFA1, solo que en este caso se obtuvo un aumento aun mayor para las muestras con sintomatología de *shock*, alcanzando 2,51 veces los niveles del control sano. RAP2-7 mostró un incremento significativo de 1,96 veces el control para las muestras de *shock*, mientras que en tejido con sintomatología de *flecking* el aislamiento CPV-4 (F-CPV-4) alcanzó un incremento de 1,67 veces. Por su parte, AP2B acumuló 1,41 veces lo correspondiente al control sano para las muestras S-90-1-1, mientras que para las muestras F-90-1-1 y F-CPV-4 fue igualmente significativo con valores de 1,24 y 1,56 veces respectivamente. Para los *targets* del miR403, observamos una acumulación aumentada en el caso del ncRNA de 1,50 veces en muestras S-90-1-1 y 1,44 veces en muestras F-90-1-1, ambas significativamente diferentes respecto del control sano. En el caso de AGO2 y AGO7, encontramos una acumulación aumentada significativamente diferente solamente para las muestras con sintomatología de *shock* (de 2,35 veces y 4,15 veces respectivamente). TIR1 y GRR1 no mostraron cambios significativos en ninguna de las muestras con respecto al control sano.

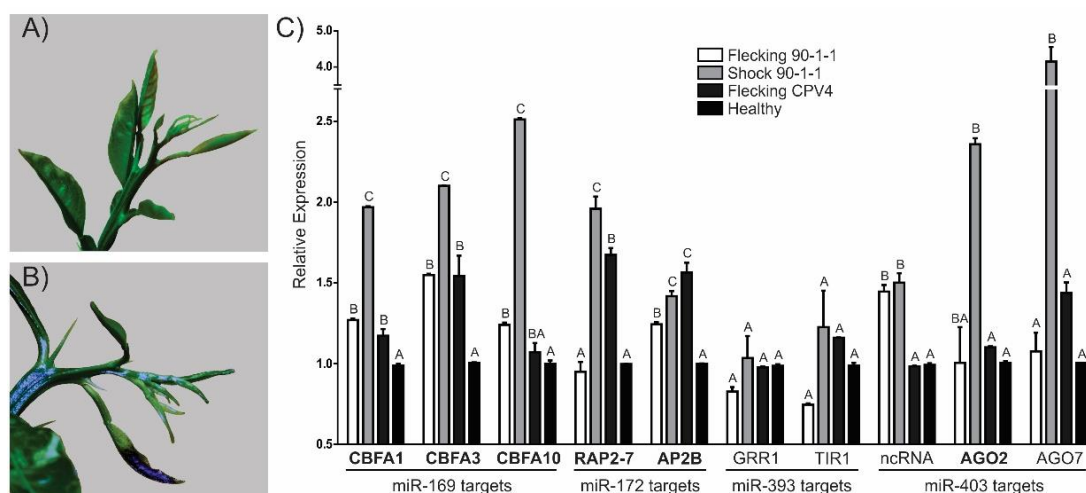


Figura 29: Síntomas observados en plantas de *Citrus sinensis* infectadas con los aislamientos de CPsV y análisis de acumulación de los *targets* de miARNs. **A)** Aclaramientos paralelos a las nervaduras o *Flecking* causado por los aislamientos 90-1-1 y CPV4 de CPsV en plantas de *C. sinensis*. **B)** Brote joven con epinastia y necrosis de las hojas (reacción de *Shock*, causada solamente por CPsV 90-1-1). Ambas imágenes fueron tomadas en plantas en el mismo estadio de desarrollo. **C)** Acumulación de los transcritos *targets* de los miARNs de interés en plantas de *C. sinensis* infectadas con los aislamientos 90-1-1 o CPV-4 de CPsV. Se realizaron ensayos de RT-qPCR para determinar los niveles de expresión de: *CCAAT-binding transcription factor* subunidad B, (Nuclear factor Y, subunidad A1 (CBFA1), subunidad A3 (CBFA3) y subunidad A10 (CBFA10), predichos para el miR169; *Ethylene-responsive transcription factor* (RAP2-7) e *Integrase-type DNA-binding superfamily protein* (AP2B), *targets* para el miR172; *Transport inhibitor response 1* (TIR1) y *GRR1-like protein 1-related* (GRR1), predichos para el miR393; y finalmente, *Argonaute 2-related* (AGO2), *Argonaute 7* (AGO7) y un ncRNA putativo, *targets* predichos para el miR403. Se muestran los promedios y las barras de error de al menos tres ensayos independientes. Se realizó un análisis *one-way ANOVA* (*Tukey post hoc test*) para evaluar las diferencias. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre muestras con un $P < 0.05$. Los nombres de los *targets* en **negrita** indican aquellos que fueron validados mediante el análisis de degradoma.

En resumen, la infección por CPsV generó una acumulación aumentada en 8 de los 10 *targets* predichos, 6 de los cuales fueron validados mediante el análisis de degradoma (Figura 29. C). Los resultados muestran un comportamiento más drástico y diferencias significativas para 7 de los *targets* en muestras con sintomatología de *shock* respecto de la de *flecking* para el mismo aislamiento (90-1-1). En muchos de esos casos, los valores correspondientes al *shock* duplicaron a los obtenidos para la sintomatología de *flecking*. Las muestras infectadas con CPV-4 generalmente mostraron cambios menores, y solo fueron significativos para el caso de 4 de los *targets* analizados al compararlos con las muestras sanas.

Discusión

En este capítulo, hemos predicho bioinformáticamente 10 genes *targets* correspondientes a cuatro miARNs de *C. sinensis* que no habían sido validados en reportes previos. Las funciones biológicas de dicho grupo comprenden a FTs y proteínas de unión a ácidos nucleicos y/o proteínas. Las proteínas NFY-A pertenecientes a la familia CBF de FTs poseen una capacidad modular considerable, debido a las diferentes subunidades que las componen. Esta característica les da versatilidad y les permite participar en distintos procesos, algunos de ellos relacionados con el desarrollo (Lee *et al.*, 2003; Pagnussat *et al.*, 2005; Ballif *et al.*, 2011; Mu *et al.*, 2013), señalizaciones mediadas por ácido abscísico, tolerancia a sequía (Warpeha *et al.*, 2007; Xue *et al.*, 2008), y respuesta a estrés mediado por proteínas del retículo endoplasmático (Liu y Howell, 2010). Además, la sobre-expresión de OsHAP2E, un miembro de la familia CBF de arroz, confiere resistencia a hongos y patógenos bacterianos (Alam *et al.*, 2015). AP2B y RAP2-7 están relacionados con el desarrollo floral y factores de respuesta a etileno (Zhu y Helliwell, 2011; Bahieldin *et al.*, 2016). TIR1 y GRR1 son factores que actúan como receptores de auxinas (Dharmasiri *et al.*, 2005). Para el caso de las proteínas Argonautas, están bien caracterizadas sus funciones de defensa en respuesta a virus, particularmente AGO2 (Alvarado y Scholthof, 2011) pero también AGO7 (Qu *et al.*, 2008). AGO2 proporciona un mecanismo antiviral secundario en aquellas condiciones en donde la actividad de AGO1 se ve comprometida, por ejemplo, por acciones de supresoras virales (Harvey *et al.*, 2011). En condiciones normales, esta función de AGO2 esta oculta debido a una regulación negativa mediada por AGO1 por medio del miR403 (Allen *et al.*, 2005). Nuestros resultados demuestran un aumento significativo de AGO2 y AGO7 en las muestras infectadas que presentan la sintomatología de *shock* respecto del control sano. Un posible efecto inhibitorio del virus sobre AGO1 podría explicar la inducción de AGO2. Además, la regulación de los ARNm de AGO2 dada por el miR403 es específica de un grupo pequeño de plantas, entre las que se encuentra *Citrus sinensis*. En miR403 está ausente en muchas monocotiledóneas y en algunos linajes de eudicotiledóneas. La secuencia de este miARN es poco diversa y en general hay muy pocas isoformas indicando la evolución reciente del miR403 (Jagtap y Shivaprasad,

2014). Se ha reportado que *C. sinensis* no solo tiene una expresión muy alta del miR403, sino que también tiene una gran capacidad para silenciar a AGO2 en comparación con otras especies de plantas (Jagtap y Shivaprasad, 2014).

Existe un número alto de metodologías por las cuales pueden identificarse y validarse genes *targets* de miARNs en plantas, incluidas el 5'-RACE. Esta aproximación experimental permite la detección de los productos de corte de transcriptos *targets* basados en PCRs. Sin embargo, puede que no siempre se correlacione con una regulación de miARN funcionalmente relevante, ya que el ensayo no es cuantitativo; y además no tiene en cuenta la contribución del silenciamiento mediado por miARN sobre la regulación general del gen *target*. Por el contrario, los análisis mediante secuenciación masiva de degradomas pueden ser más apropiados para detectar *targets* funcionalmente relevantes o fuertemente regulados. En este capítulo, hemos validado 6 de los 10 *targets* predichos mediante el uso de datos de degradoma públicos de *C. sinensis* (Liu *et al.*, 2014). Este resultado, demuestra que el análisis de degradomas es capaz de validar con éxito *targets* de miARNs predichos bioinformáticamente con un buen nivel de precisión y eficiencia. A su vez, mediante el análisis de degradoma se encontraron otros *targets* no predichos para el grupo de miARNs en cuestión, lo que podría ampliar el rango de regulación para estos miARNs.

Hay algunos reportes que muestran una alteración de la acumulación de miARNs y sus genes *targets* específica de la cepa viral. Estos cambios, a menudo muestran dependencia con el huésped y se correlacionan con la severidad de los síntomas (Xu *et al.*, 2014; Yin *et al.*, 2018). Yin y colaboradores (2018) demostraron que la forma más agresiva de Potato virus Y (PVY) altera un gran número de miARNs, y que lo hace en mayor medida que las versiones de PVY más leves. Estudios llevados a cabo en arroz también mostraron alguna correlación entre la expresión de *targets* y el desarrollo de síntomas. Sin embargo, los patrones de expresión de los *targets* de miARNs pueden ser extremadamente complejos y variados dependiendo del tipo de tejido y el tiempo post-inoculación en que se realiza el análisis (Liang *et al.*, 2019).

Aquí demostramos que para 7 de los 10 *targets* analizados por RT-qPCR (correspondientes a los 4 miARNs que restaba evaluar del trabajo de Reyes y

colaboradores (2016)), hubo una correlación positiva entre la acumulación del transcripto y la severidad de los síntomas, con niveles de acumulación de *targets* más altos en muestras con sintomatología de *shock* comparados con las muestras de *flecking* para el mismo aislamiento viral. Este es el caso de los tres CBFAs *targets* del miR169, AP2B y RAP2-7 *targets* del miR172 y las dos proteínas AGO, *targets* del miR403. Seis de ellos, además, coinciden con los *targets* validados mediante el análisis de degradoma. La participación de estos FTs en la activación de genes relacionados con la necrosis en plantas de naranjo infectadas con CPsV y la posible participación de las proteínas AGO en respuesta a esta reacción, sería una característica interesante de ser evaluada en un futuro. Por su parte, la acumulación de TIR1 y GRR1 (*targets* del miR393) no fue significativamente diferente en las muestras infectadas respecto de las sanas, al igual que no fue posible validarlos mediante análisis de degradoma de hoja, lo que plantea la pregunta de si estos *targets* predichos están realmente regulados por el miR393 en *C. sinensis* y conlleva a la necesidad de predecir nuevos.



CAPÍTULO 4:

Análisis de interacción entre la proteína 24K^{CPsV} y
proteínas de la maquinaria de procesamiento de
miARNs

Introducción

La proteína 24K^{CPsV}

Como se mencionó en la introducción, el ARN 1 de CPsV codifica en su extremo 5' para la proteína más pequeña del virus, de aproximadamente 24 kDa, denominada proteína 24K (24K^{CPsV}). Estudios previos de nuestro laboratorio (Reyes *et al.*, 2016; Robles Luna *et al.*, 2017), han reportado que esta proteína está involucrada en la supresión del PTGS y tiene la capacidad de unir ARNdh largos. Además, en el Capítulo 2 de este trabajo, hemos descripto la asociación de 24K^{CPsV} con pre-miARNs.

Como se señala en la Figura 30, análisis previos de 24K^{CPsV} fusionada a proteínas reporteras expresada transitoriamente en células epiteliales de *N. benthamiana* han mostrado una localización fundamentalmente nuclear, y nucleolar, pero también se acumula en menor medida en citoplasma. Forma agregados en el nucleoplasma y también se ubica en *Cajal bodies* (CBs) (Reyes *et al.*, 2016; Borniego, 2017). Sin embargo, se vio que algunos agregados no co-localizaban con la proteína U2B (marcador de CBs) (Figura 30), por lo cual puede inferirse que 24K^{CPsV} se acumula en otro tipo de agregados, como podrían ser los *D-bodies* (Borniego, 2017).

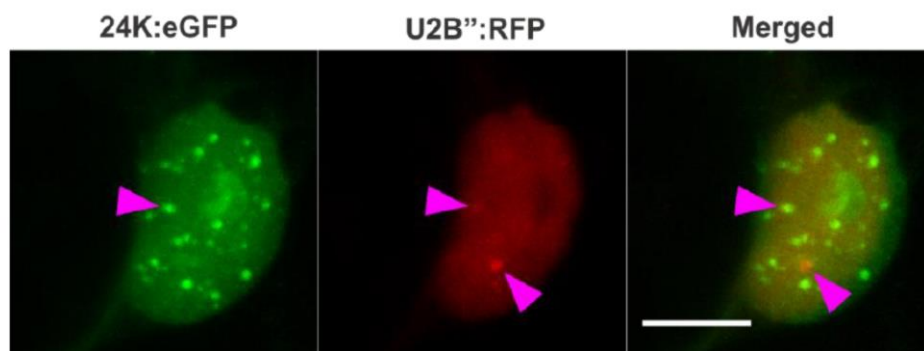


Figura 30: Localización subcelular de 24K^{CPsV}:eGFP. Co-expresión con U2B::RFP (marcador de CBs). Las puntas de flecha marcan los agregados en nucleoplasma. La imagen indica la formación de más de un tipo de agregados. Escala=10µm. Tomado de Borniego, (2017).

Localización subcelular y patrones de expresión de DCL1, HYL1 y SE

Como se mencionó anteriormente, el componente central del complejo procesador de miARNs en plantas está constituido por DCL1, HYL1 y SE. Ensayos realizados en *A. thaliana* permitieron conocer la localización subcelular de estas proteínas, así como también, identificar nuevos cuerpos nucleares en la célula vegetal (Han *et al.*, 2004; Fang y Spector, 2007; Song *et al.*, 2007).

Mediante el uso de plantas transgénicas que expresan las proteínas de maquinaria de procesamiento de miARNs fusionadas a un gen reportero, se describieron los cuerpos nucleares ocupados por ellas (Fang y Spector, 2007). Se determinó que DCL1 se expresa de forma difusa en el núcleo y además genera un número bajo de agregados nucleares, que se localizan cerca del nucleolo, pero no lo ocupan (Fang y Spector, 2007). HYL1 mostró un patrón de localización similar a DCL1, excepto que su señal era normalmente más fuerte. Un estudio previo, mostró que la expresión transitoria de HYL1 localizaba a la proteína también en el citoplasma, pero mayormente en agregados nucleares discretos o formando una estructura de anillo rodeando el nucleolo (Han *et al.*, 2004). A diferencia de las anteriores, SE mostró un patrón sub-nuclear heterogéneo y dependiente del tipo celular. Se observó que puede generar agregados nucleares discretos, pero también un número alto de agregados pequeños formando lo que se denomina *speckles*. Tampoco ocupa el nucleolo (Fang y Spector, 2007).

Además de conocer la localización subcelular y las características estructurales de estas proteínas (Figura 7), estudiar la co-localización y la posible interacción entre ellas constituyó un gran avance en el estudio del complejo procesador de miARNs. Se observó que la totalidad de los cuerpos formados por DCL1 son también ocupados por HYL1 (Fang y Spector, 2007). Por el contrario, solo un ~20% de los cuerpos formados por HYL1 fueron también ocupados por SE. Este bajo porcentaje podría entenderse teniendo en cuenta el hecho de que SE, como se dijo anteriormente, está involucrada en otras funciones del metabolismo del ARN (Iwata *et al.*, 2013; Laubinger *et al.*, 2008; Raczynska *et al.*, 2014).

Los *Dicing bodies* (D-bodies)

Si bien en un principio se creyó que los cuerpos nucleares donde co-localizaban DCL1, HYL1 y SE eran CBs, por su forma redonda y su distribución perinucleolar (Shaw y Brown, 2004; Nizami *et al.*, 2010), ensayos de co-localización con marcadores de CB como coilina y U2B descartaron esta hipótesis (Fang y Spector, 2007). Sobre la base de estos datos, y conociendo las funciones en las que están involucradas DCL1, HYL1 y SE, se denominó a estos agregados como *Dicing bodies* o cuerpos-D. Los *D-bodies* son diferentes a la mayoría de los cuerpos nucleares conocidos, debido a su forma redonda, tamaño y número promedio por núcleo (Shaw y Brown, 2004), pero similares a los CBs (Nizami *et al.*, 2010). En este escenario, se planteó que los pri-miARNs podrían ser reclutados a los *D-bodies*, donde serían procesados por DCL1 (Fang y Spector, 2007). Sin embargo, no hay pruebas suficientes de que el procesamiento tenga lugar exclusivamente en estas estructuras (Achkar *et al.*, 2016). Se ha observado también que AGO1 se localiza en *D-bodies* además de su distribución en nucleoplasma y citoplasma (Fang y Spector, 2007), aunque no se conoce con precisión el significado biológico de dicha localización.

Objetivos

Con la intención de caracterizar posibles dominios de interacción de la 24K^{CPsV} con ácidos nucleicos y/o proteínas celulares y/o virales decidimos analizar bioinformáticamente la secuencia de la misma. A su vez, nos propusimos evaluar la co-localización subcelular de esta proteína viral con proteínas de la maquinaria de procesamiento de miARNs (DCL1, HYL1 y SE) y analizar una posible interacción con ellas, tanto para la versión *wild-type* como para versiones mutantes de 24K^{CPsV}.

Resultados

IV. Análisis de interacción entre la proteína 24K^{CPsV} y proteínas de la maquinaria de procesamiento de miARNs

IV. I. Análisis bioinformático de la proteína 24K^{CPsV}

Como es sabido, las VSR presentan una gran variabilidad respecto a su secuencia, razón por la cual muchas veces resulta complejo determinar los motivos que facilitan las funciones halladas (Csorba *et al.*, 2015; Yang y Li, 2018). A su vez, estas proteínas generalmente presentan más de una función, lo que le permite a los virus, con un número bajo de proteínas, realizar todas las funciones necesarias para su replicación y diseminación (Bayne *et al.*, 2005; Harrison y Robinson, 2005; Kasschau y Carrington, 1998).

IV. I. A. Señales de localización nucleares: NLS, NoLS y NES

Con la intención de determinar posibles motivos o dominios funcionales de la proteína 24K^{CPsV}, se realizó un análisis bioinformático de la secuencia aminoacídica de la misma, utilizando servidores *online*. Un análisis similar había sido realizado previamente en nuestro laboratorio (Robles Luna, 2014; Borniego, 2017). Haciendo uso de servidores actualizados, repetimos los análisis buscando ahondar en los resultados encontrados.

Como primera aproximación, se decidió realizar una búsqueda de señales de localización nuclear (NLS) de la proteína, de las cuales se tiene bastante información y han sido clasificadas en diferentes grupos (Hiscox, 2007; Macara, 2001). Para ello, se utilizaron los *software* ScanProsite (de Castro *et al.*, 2006) y WoLF PSORT (Horton *et al.*, 2007) pero ninguno de ellos predijo una NLS. Si bien en los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios para desarrollar métodos de predicción de la localización subcelular de proteínas tanto eucariotas como procariotas (Cedano *et al.*, 1997; Chou, 2001; Chou y Elrod, 1999; Nakai, 2000; Nakai y Horton, 1999; Nakashima y Nishikawa, 1994), los mismos no están especialmente desarrollados para predicciones en proteínas virales (Shen y Chou, 2007).

Al contrario de lo que ocurre con las NLSs, los motivos que funcionan como señales de localización nucleolar (NoLSs) se han caracterizado por ser ricos en residuos arginina (R) y lisina (K) pero no hay secuencia o estructura consenso que las caracterice (Carmo-Fonseca *et al.*, 2000). La localización de una proteína en el nucleolo puede estar gobernada por varios factores, como pueden ser la asociación con proteínas nucleolares o moléculas de ARN que se están transcribiendo o que se localizan en el nucleolo (Talianky *et al.*, 2010). Al realizar la búsqueda de NoLSs sobre la 24K^{CPsV} con el *software* NOD (Scott *et al.*, 2010; Scott *et al.*, 2011) no se encontraron regiones de secuencia con motivos NoLSs putativos. Sin embargo, al realizar el análisis con las secuencias de las proteínas homólogas de ophiovirus (sección V.I.D de Materiales y Métodos), el mismo servidor predice una NoLS putativa en la proteína homóloga 23K de BIMaV (Blueberry mosaic associated virus) cuya secuencia es 3-VCDRNNRKDRSFKRYKLSSKELI-25. Contrariamente a lo encontrado en el análisis previo, no se detectaron NoLSs en la proteína 25K de MiLBVV (Mirafiori lettuce big-vein virus) con este predictor. Estos resultados indican que no debería descartarse la posibilidad de una secuencia similar a la de la proteína 23K^{BIMaV} con función NoLS en la proteína 24K^{CPsV} que no es detectada por los servidores disponibles.

Como se mencionó anteriormente, la proteína 24K^{CPsV} además de localizarse en el núcleo y nucleolo, se encuentra en el citoplasma. Es por esto que se decidió evaluar la presencia de señales de exportación nuclear (NES) sobre su secuencia aminoacídica. Los resultados previos de Borniego (2017), habían identificado 3 señales NES con buena probabilidad mediante el uso de 3 predictores LocNES (Xu *et al.*, 2015), NetNES (la Cour *et al.*, 2004) y ValidNES (Fu *et al.*, 2013), las cuales se encontraban solapadas: 148-EQEITEELLKKLKII-162, 156-LKKLKIIIS-164 y 156-LKKLKI-161, respectivamente. Al rehacer el análisis con estos predictores, se pudo predecir solamente una NES con el *software* NetNES cuya secuencia es 156LKKLKIIIS164 (Figura 31). Además, en los resultados anteriores se habían detectado señales NES para el caso de la proteína 23K^{BIMaV}, pero en nuestro análisis, solo la proteína 24K^{CPsV} alcanzó valores de *score* significativamente relevantes con estos predictores.

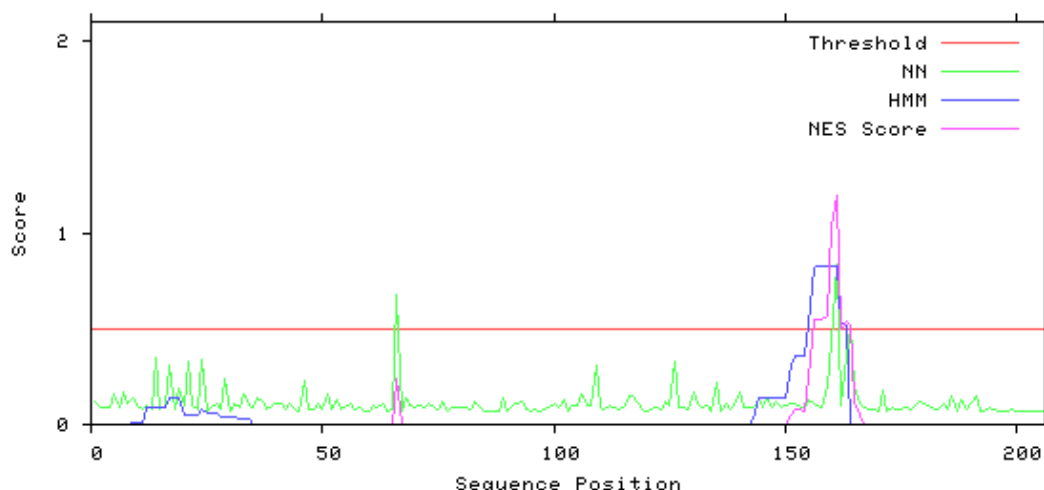


Figura 31: Gráfico de los valores predichos (*score*) por el servidor NetNES para cada posición. El servidor calcula el ‘NES score’ para cada residuo a partir de los *score* predichos por HMM (*Hidden Markov Model*) y ANN (*Artificial Neural Network*). Se muestran los tres valores para cada posición. Si el ‘NES score’ sobrepasa el umbral (*Threshold*), entonces se espera que esa posición participe en una señal de exportación nuclear.

IV. I. B. Predicción de regiones de unión a ácidos nucleicos

Como se demostró en el Capítulo 2 de este trabajo, la proteína 24K^{CPsV} presenta la capacidad de interactuar con pre-miARNs mediante ensayos *in vivo* en plantas de *N. benthamiana*. Sumado a ello, se ha demostrado la capacidad de esta proteína de unir ARNdh largos *in vitro* (Robles Luna *et al.*, 2017). Buscando caracterizar las posibles regiones de la proteína que intervinieran, se realizó una predicción de motivos de unión a ARN utilizando el *software* FastRNABindR (Wang y Brown, 2006) y Pprint (Figura 32. A; Kumar *et al.*, 2008). Consistentemente al análisis previo de estas proteínas, la predicción recae sobre los residuos N¹¹, H¹³, K¹⁴ y W¹⁵ (numeración sobre la secuencia de la proteína 24K^{CPsV}). Esta región de la secuencia se alinea además con los residuos con capacidad de unión a ARN predichos para los homólogos de ophiovirus por el mismo servidor (Figura 32. B). A su vez, mediante Pprint se predice una región de ~20 aminoácidos sobre el C-terminal de 24K^{CPsV} con capacidad de unión a ARN.

A)

Red: Interacting residues Blue: Non-interacting residues

MAEYIEVRVENLHKWGLELNTEQIETLSKKLKNIVNEDCIMKTSRIIGMWIFMPDIVQES
 LKDSPLVTKKAWIIPHERTYKTIYKGDGIQMAVTQNEEDLFKDPEFFMISRCDSVMLTKN
 NKTIINKELMNCDISQDMLFNMLSCQEITEELLKKLKIISNPKERLENKIDEVFW
 NSTRILNWIQHNDNSGNSSDNSFRE

B)



Figura 32: Predicción de los posibles sitios de unión a ARN de la proteína 24K^{CPsV}. A. Usando el *software* Pprint se predijeron las regiones con capacidad de unión a ARN (marcadas en rojo) para la proteína 24K^{CPsV}. B. Haciendo uso del *software* PROMALS (Pei y Grishin, 2007) se realizó un alineamiento entre las proteínas homólogas de los ophiovirus. El programa colorea la secuencia dependiendo de la estructura secundaria predicha por PSIPRED (rojo: α -hélice; azul: lámina- β , contempladas también en el consenso como 'h' y 'e', respectivamente). Se recuadran en verde sobre el alineamiento los aminoácidos que presentaron capacidad de unión a ARN mediante la predicción de Pprint en (A).

La Figura 33 muestra la predicción de estructura tridimensional realizada por Borniego (2017) sobre la proteína 24K^{CPsV} utilizando el *software* I-TASSER (Yang *et al.*, 2015), en el cual se resaltan los residuos cuya probabilidad de unión a ARN se conserva en las 4 proteínas de los ophiovirus.

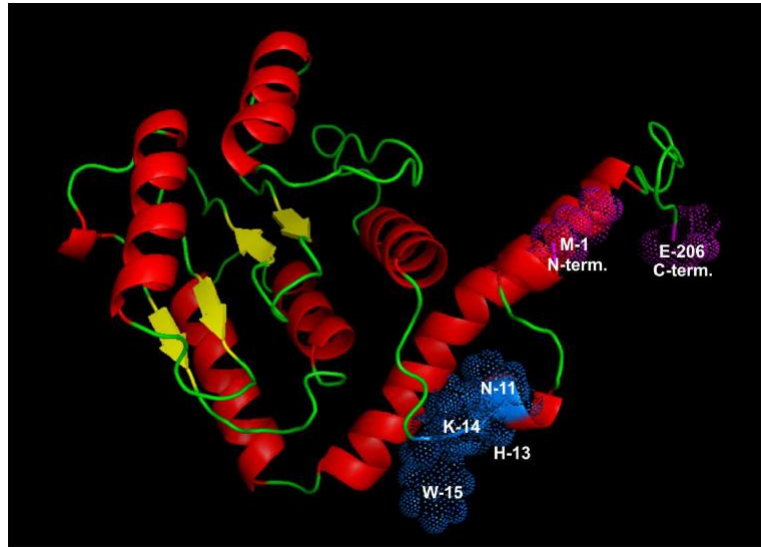


Figura 33: Modelado estructural de 24K^{CPsV} realizado con el servidor I-TASSER. Se marcan en azul los residuos de unión a ARN conservados. En magenta se marcan los extremos N-terminal (M-1) y C-terminal (E-206) de la secuencia. El modelo propuesto posee un C-score=-4.46. Tomado de Borniego (2017).

IV. I. C. Motivos GW/WG y dominios F-box

Como se ha mencionado en la introducción, muchas VSRs llevan a cabo su función mediante la unión con proteínas AGO y la inhibición de la actividad *slicer* de la misma. Ejemplos de ello son las proteínas 2b de CMV y P0 de poliovirus (Pazhouhandeh *et al.*, 2006). Antecedentes de Robles Luna y colaboradores (2017) sugirieron una posible interacción de la proteína 24K^{CPsV} con AGO1 evidenciada por ensayos con construcciones sensoras.

Las proteínas AGO interactúan con proteínas que se caracterizan por la presencia de motivos secuenciales repetidos que contienen dos aminoácidos: glicina (G) y triptófano (W), conocidos como motivos WG/GW (El-Shami *et al.*, 2007). Estos dominios son extremadamente divergentes ya sea en secuencia, repeticiones e incluso estructura, pero a pesar de ello suelen tener un número alto de los aminoácidos glicina (G), serina (S) y triptófano (W), y bajos niveles de cisteína (C), fenilalanina (F), histidina (H), metionina (M) y tirosina (Y) (Karlowski *et al.*, 2010). Los motivos WG/GW median la interacción directa con varios miembros de la familia de proteínas AGO en eucariotas. También se ha identificado un motivo WG/GW en la proteína SE (Bednenko *et al.*, 2009; Ding *et*

al., 2005; Eulalio *et al.*, 2009; He *et al.*, 2009; Jakymiw *et al.*, 2005; Karlowski *et al.*, 2010; Partridge *et al.*, 2007; Till *et al.*, 2007).

Con el fin de determinar si la proteína 24K^{CPsV} presenta dominios del tipo GW/WG con los que pudiese interactuar con AGO1 o SE, se realizó una predicción utilizando el *software* AGOS (Zielezinski y Karlowski, 2011), encontrándose un posible sitio (11-NLHKWGLE-18) pero con una baja compatibilidad de composición.

Las proteínas F-box (FBP) son una de las superfamilias de proteínas más grandes de plantas y, además, en comparación con otros reinos, presentan una gran diversidad (Abd-Hamid *et al.*, 2020). Las FBP se caracterizan por la presencia de un motivo poco conservado compuesto por ~40-60 aminoácidos con pocas posiciones invariables a lo largo de la secuencia consenso. Estas posiciones están ocupadas generalmente por una combinación de dipéptidos Leucina-Prolina (LP) altamente conservados y varios otros aminoácidos hidrofóbicos (Valina, Isoleucina y Metionina) (Abd-Hamid *et al.*, 2020). Debido a la variabilidad de estos motivos, solo las bases de datos Pfam y Prosite (Kipreos y Pagano, 2000; Kumar y Paietta, 1998) son capaces de identificarlos (Abd-Hamid *et al.*, 2020). La heterogeneidad de estos motivos pudo comprobarse mediante los logos HHM (*Hidden Markov Models*) de Pfam (<https://pfam.xfam.org/>), altamente variables. Se ha informado que los motivos F-box median interacciones proteína-proteína y provocan la acción del complejo SCF (o *SCF complex*, *S-phase kinase-associated protein 1 (SKP1)-cullin 1 (CUL1)-F-box protein (SCF) complex*), el cual genera la ubiquitinación de la proteína blanco y su degradación en proteosomas (Abd-Hamid *et al.*, 2020).

Se ha reportado que la proteína P0 de poliovirus, provoca la degradación de AGO1 mediada por ubiquitinación, y que esto se logra mediante la intervención de un motivo F-box presente en esta proteína (Pazhouhandeh *et al.*, 2006; Baumberger *et al.*, 2007; Bortolamiol *et al.*, 2007; Derrien *et al.*, 2018).

Con la intención de identificar la presencia de posibles motivos F-box en la proteína 24K^{CPsV} se analizó su secuencia mediante las plataformas Pfam y PROSITE. Ninguna de ellas identificó un F-box. Llamativamente, al realizar un alineamiento local con una FBP de *C. sinensis* (A0A067DVV4) cuyo tamaño es

similar a la proteína viral, se encontró una región con un 53% de similitud de secuencia con la 24K^{CPsV} dentro de su F-box (Figura 34).

24K	48	GMWI-FMPDIVQESLKDSPLVTKKAWIIPHER	78	Identity:	8/32 (25.0%)
		. . .: ::: .::... . :: ::	78	Similarity:	17/32 (53.1%)
A0A067DVV4	55	GSWAGLLPELLGEIIRRVETTEDSW--PHRQ	83	Gaps:	4/32 (12.5%)
				Score:	31.5

Figura 34: Alineamiento local entre la proteína 24K^{CPsV} y la proteína F-box A0A067DVV4 de *C. sinensis*. El alineamiento local realizado por *EMBOSS Water* (Madeira *et al.*, 2019) muestra una similitud superior al 50% con la proteína viral. (|) indican aminoácidos idénticos; (:) indican cambios conservativos.

IV. II. Análisis de la interacción de la proteína viral 24K^{CPsV} con proteínas de la maquinaria de procesamiento DCL1^{At}, HYL1^{At} y SE^{At}

IV. II. A. Estudio de la expresión de las proteínas ensayadas

A partir de construcciones generadas previamente en el laboratorio se realizó la fusión de la proteína 24K^{CPsV} a la proteína reportera mRFP (sección V.I.G. de Materiales y Métodos), para poder utilizarla en ensayos de expresión transitoria en células epiteliales de *N. benthamiana*. A su vez, contamos con los vectores generados por Fang y Spector (2007) para las proteínas de maquinaria de procesamiento de *A. thaliana* fusionadas a proteínas reporteras (CFP:DCL1^{At}, HYL1^{At}:YFP y SE^{At}:YFP). Todos estos vectores se introdujeron en células de *A. tumefaciens* para poder realizar los ensayos en planta.

En primera instancia, se analizó la localización subcelular de las construcciones con las que contábamos en plantas de *N. benthamiana* mediante ensayos de expresión transitoria (Figura 35).

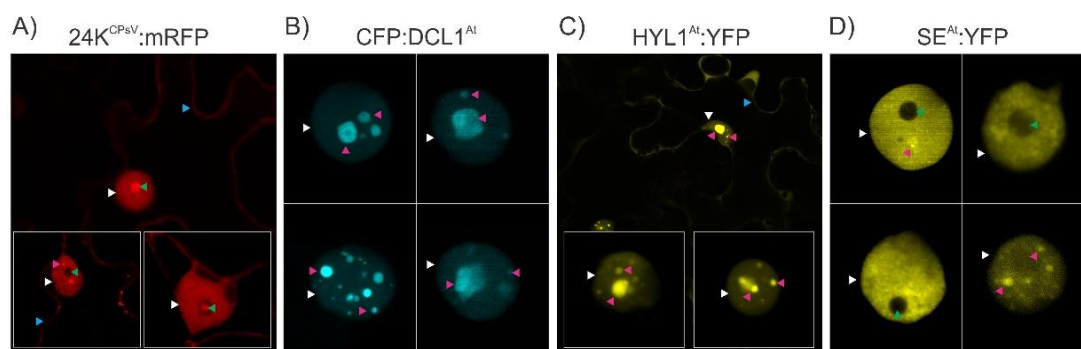


Figura 35: Localización subcelular de 24K^{CPsV} y de las proteínas CFP:DCL1^{At}, HYL1^{At}:YFP y SE^{At}:YFP. Se observó expresión de la proteína 24K^{CPsV}:mRFP principalmente en núcleo y nucleolo, además de citoplasma. Todas las proteínas de maquinaria se observan en el núcleo (pero no en nucleolo), y todas formando agregados. La proteína HYL1 se encuentra también en citoplasma. Para el caso de SE se observó el patrón de *speckles* reportado. La puntas de flechas blancas indican núcleo; las verdes nucleolo; las magenta agregados; y las celestes citoplasma.

Cuando se analiza la expresión de la proteína de fusión 24K^{CPsV}:mRFP se observa que a partir de los 2-3 dpa comienzan a ocuparse los núcleos y aparecen pequeños agregados en el nucleoplasma (Figura 35. A). Luego de 3-4 dpa la mayoría de las células poseen los núcleos e incluso los nucleolos ocupados. Este patrón de expresión se corresponde con lo observado anteriormente en el laboratorio para las fusiones a GFP de esta proteína (Reyes *et al.*, 2016; Borniego, 2017).

Para el caso de las proteínas de maquinaria, los patrones observados se corresponden a los reportados en la bibliografía para plantas de *A. thaliana* (Figura 35. B-D; Fang y Spector, 2007). Se observa que tanto DCL1 como HYL1 forman agregados nucleares discretos, mientras que en el caso de SE, el número de pequeños agregados es muy alto, dando lugar al patrón de *speckles* reportado previamente. Cabe destacar que la expresión de estas proteínas es normalmente mucho más alta que la obtenida para la proteína viral.

IV. II. B. Ensayos de co-localización entre 24K^{CPsV} y las proteínas de la maquinaria de procesamiento

Para poder estudiar si la proteína 24K^{CPsV} co-localiza en *D-bodies* con las proteínas de maquinaria de procesamiento de miARNs se realizaron ensayos de co-expresión en plantas de *N. benthamiana* utilizando las construcciones mencionadas. En todos los casos también se co-infiltró la proteína supresora p19. Además, se co-infiltraron las proteínas de maquinaria con la proteína mRFP sin fusionar, utilizada como control negativo de interacción en estos ensayos. Se agroinfiltraron las muestras a una DO^{600nm} de entre 0,2 y 0,35 y, a los 3-4 dpa, fueron observadas al microscopio confocal de fluorescencia.

En la Figura 36 se muestran los resultados obtenidos para cada combinación. Como se puede apreciar, la proteína 24K^{CPsV}:mRFP muestra co-localización con las tres proteínas de maquinaria ensayadas en algunos agregados nucleares discretos. Para el caso del control negativo, se observa que los agregados nucleares formados por las proteínas de maquinaria no co-localizan con mRFP, lo que indica que el patrón observado previamente es provocado por la proteína viral 24K^{CPsV} y no por la proteína reportera que tiene fusionada.

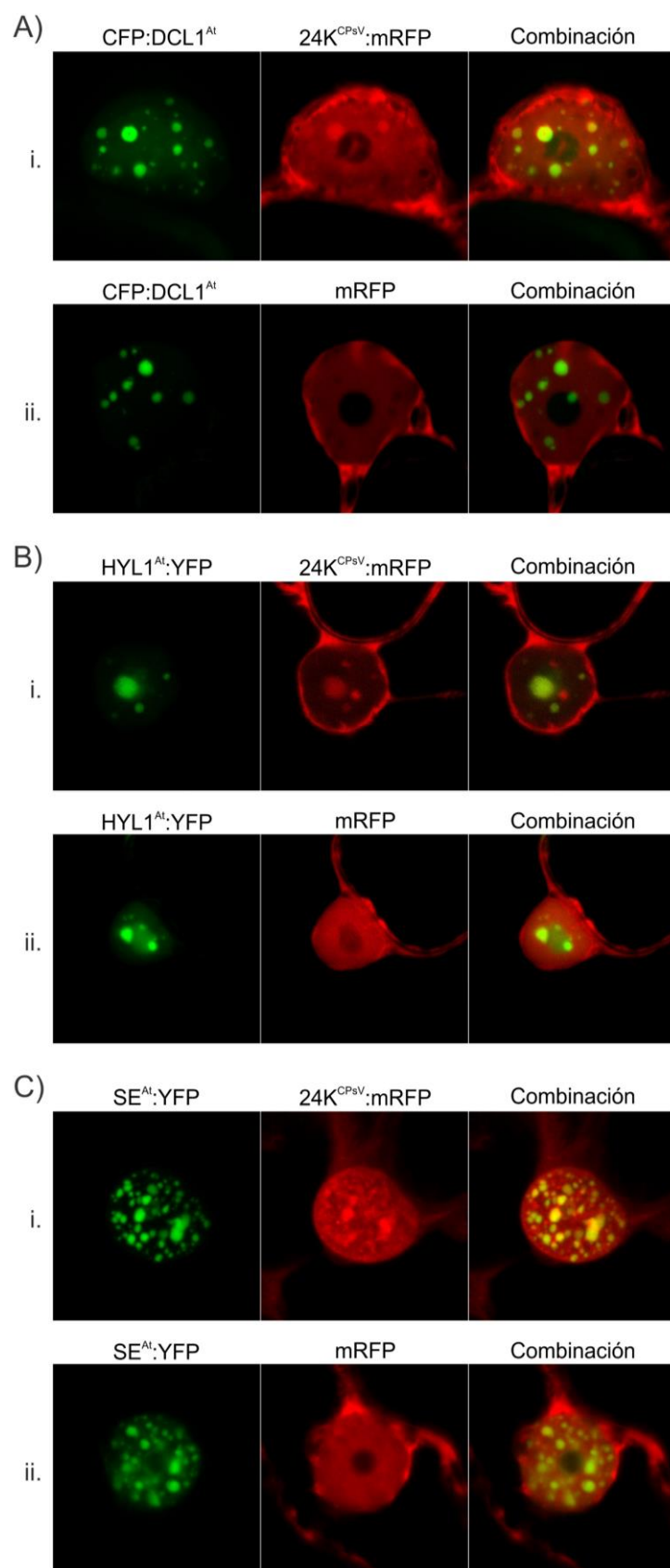


Figura 36: Co-localización entre la proteína viral 24K^{CPsV} y proteínas de la maquinaria de procesamiento de miARNs. **A. i.** Co-localización de 24K^{CPsV}:mRFP con CFP:DCL1^{At}; **ii.** El control negativo mRFP sin co-localizar en agregados nucleares con CFP:DCL1^{At}. **B. i.** Co-localización de 24K^{CPsV}:mRFP con HYL1^{At}:YFP; **ii.** El control negativo mRFP sin co-localizar en agregados nucleares con HYL1^{At}:YFP. **C. i.** Co-localización de 24K^{CPsV}:mRFP con SE^{At}:YFP; **ii.** El control negativo mRFP sin co-localizar en agregados nucleares con SE^{At}:YFP.

Se chequeó el nivel de expresión y la integridad de las proteínas de fusión mediante *western blot* con anticuerpos específicos para las proteínas reporteras. Como se muestra en la Figura 37, se pudieron detectar todas las fusiones ensayadas.

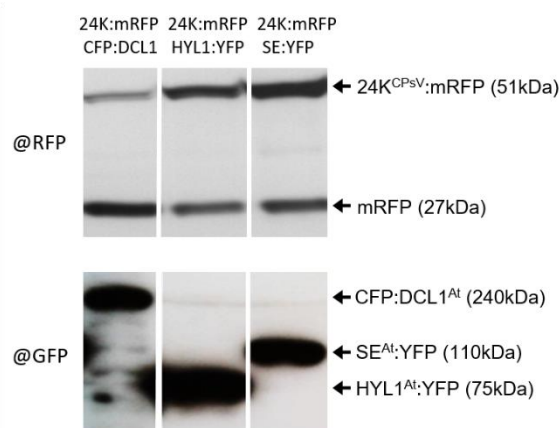


Figura 37: Ensayo de *Western blot* de los extractos proteicos obtenidos de hojas de *N. benthamiana* a los 3 dpa. La proteína 24K^{CPsV}::mRFP se co-infiltró con las proteínas de maquinaria CFP:DCL1^{At}, HYL1^{At}:YFP o SE^{At}:YFP. Las proteínas se revelaron con anticuerpos monoclonales anti-RFP y anti-GFP. Se observa además acumulación de mRFP libre, proveniente de la fusión 24K^{CPsV}::mRFP.

IV. II. C. Análisis de interacción de proteínas mediante ensayos de co-inmunoprecipitación (CoIP)

Una vez corroborada la co-localización en cuerpos nucleares, se procedió a analizar la posible interacción entre estas proteínas mediante ensayos de co-inmunoprecipitación (CoIP). Como se mencionó anteriormente, una de las complicaciones que se presentó a la hora de realizar estos experimentos, era la gran cantidad de mRFP libre que se acumulaba al realizar extracciones de proteínas totales en muestras que expresaban la fusión 24K^{CPsV}::mRFP. Debido a ello, se optó por realizar los ensayos utilizando purificaciones parciales de núcleos las cuales permitían reducir de forma considerable el porcentaje de mRFP al eliminar la fracción citoplasmática de la misma (sección V.II.O de Materiales y Métodos).

Para evaluar la interacción entre HYL1^{At} y 24K^{CPsV}::mRFP se utilizó el sistema de *SureBeads Protein-A magnetic bead (Bio-Rad)* al cual se le adosó el anticuerpo anti-HYL1 (Agrisera). Para estos ensayos se utilizó como control negativo las *beads* sin el anticuerpo anti-HYL1. En este caso, las plantas se agroinfiltraron

con un vector que permite la expresión de HYL1^{At} sin fusionar y, además, la construcción 24K^{CPsV}:mRFP. En la Figura 38 se muestra el resultado de este ensayo, en donde se pudo corroborar la interacción entre la proteína viral y HYL1^{At}. A su vez, pudimos mejorar la calidad de la detección y perdimos la interferencia generada por la proteína mRFP libre.

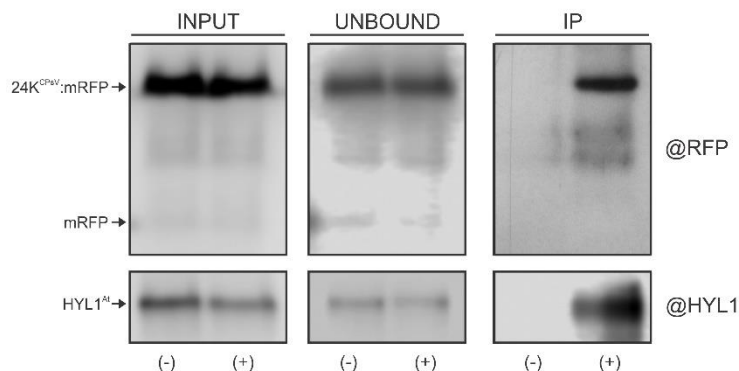


Figura 38: Ensayo de CoIP entre la proteína 24K^{CPsV}:mRFP y HYL1^{At}. En la figura se indican las tres fracciones. Los controles INPUT y UNBOUND, corresponden a condiciones de entrada y salida sin unirse al sistema de *beads* empleado, respectivamente. La fracción IP indica las proteínas inmunoprecipitadas. (-): corresponde al control negativo utilizando las *beads* sin el anticuerpo anti-HYL1. (+): corresponde a las muestras inmunoprecipitadas con el @HYL1 unido a las *beads*. Se muestran los revelados para el anticuerpo monoclonal anti-RFP (@RFP) y anti-HYL1 (@HYL1) en cada caso. La presencia de ambas proteínas en la fracción IP indica interacción.

Por otra parte, para evaluar la posible interacción entre las proteínas CFP:DCL1^{At} y SE^{At}:YFP con 24K^{CPsV}:mRFP se utilizó el sistema GFP-Trap (Chromotek, Alemania), que es el mismo que se utilizó para los ensayos de RIP del Capítulo 2. Presenta la ventaja de tener la misma capacidad de unión para cualquiera de las variantes de GFP utilizadas en estos ensayos (CFP o YFP, respectivamente), por lo que podemos evaluar ambas interacciones utilizando el mismo sistema. Cabe aclarar que, para confirmar si el sistema GFP-Trap estaba funcionando de manera correcta y comprobar si las fusiones a genes reporteros interferían en la interacción, se optó por repetir los ensayos de CoIP para el caso de HYL1^{At}:YFP y 24K^{CPsV}:mRFP. Los resultados obtenidos (no mostrados) indicaron nuevamente una interacción positiva entre ambas proteínas.

En la Figura 39 se muestra el resultado obtenido para la proteína SE^{At}.

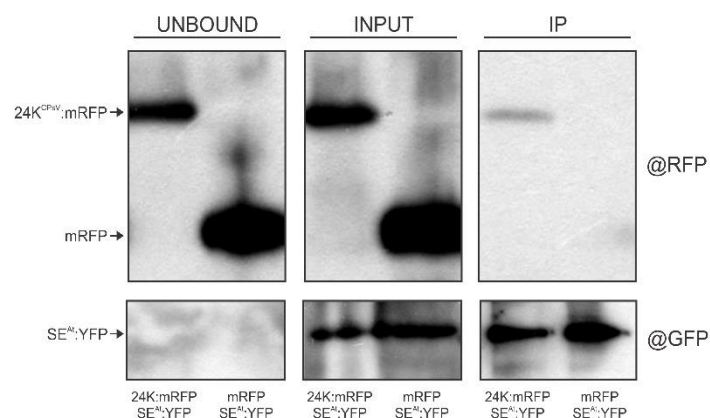


Figura 39: Ensayo de CoIP entre la proteína 24K^{CPsV}:mRFP y SE^{At}:YFP. En la figura se indican las tres fracciones. Los controles INPUT y UNBOUND corresponden a condiciones de entrada y salida sin unirse al sistema de *beads* empleado, respectivamente. La fracción IP indica las proteínas inmunoprecipitadas. Se utilizó mRFP libre como control negativo. Se muestran los revelados para el anticuerpo anti-RFP (@RFP) y anti-GFP (@GFP) en cada caso. La presencia de ambas proteínas en la fracción IP indica interacción.

Los resultados obtenidos indican que la proteína 24K^{CPsV} interacciona con la proteína accesoria de la biogénesis de miARNs, SE^{At}. Nuevamente, se pudo evitar la interferencia de la proteína mRFP libre para el caso de la fusión a 24K^{CPsV} mediante la purificación de núcleos.

Para el caso de los ensayos con la proteína DCL1^{At}, no se logró obtener un resultado claro, ya que pese a tener una buena expresión de las proteínas en planta, no fue posible detectar la proteína DCL1^{At} en los controles *Inputs* analizados por *Western blot*. Una potencial explicación es la posibilidad de que la proteína DCL1^{At}, que tiene un peso molecular elevado, esté precipitando agregada a restos de membranas o formando agregados macromoleculares que la dejen en un estado insoluble al realizar las extracciones de proteínas del núcleo.

IV. II. D. Análisis de interacción de proteínas mediante complementación bimolecular fluorescente (BiFC)

Para confirmar las interacciones encontradas mediante CoIP, se llevaron a cabo ensayos de complementación bimolecular fluorescente (BiFC). Esta técnica permite realizar una observación *in vivo* de las interacciones. Para ello, se clonaron las secuencias codificantes de las proteínas 24K^{CPsV}, DCL1^{At}, HYL1^{At} y SE^{At} en los vectores binarios pROK2-sYFPN e pROK2-sYFPC adaptados para

BiFC (González *et al.*, 2010). Estos, cuentan con las regiones N-terminal y C-terminal de la proteína fluorescente YFP. Esquemas de las construcciones obtenidas se detallan en la Figura 40. A. Además, se utilizaron vectores para BiFC conteniendo las regiones N-terminal y C-terminal de la proteína reportera Citrina fusionadas a las proteínas DCL1^{At}, HYL1^{At} y SE^{At} (Figura 40. B; cedidos gentilmente por el laboratorio de Biología del ARN-IAL-Santa Fe) y se clonó la proteína 24K^{CPsV} también en estos vectores.

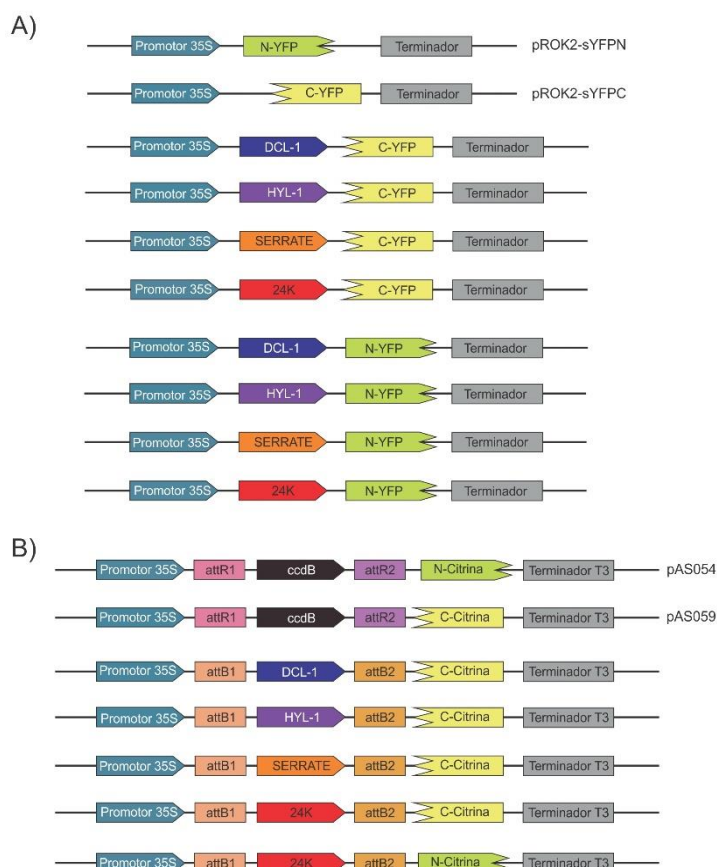


Figura 40: Representación esquemática de los vectores usados para el análisis de interacciones mediante BiFC. A. Vectores pROK2-sYFPN y pROK2-sYFPC (González *et al.*, 2010) seguido de las versiones conteniendo las proteínas de maquinaria de *A. thaliana* o la proteína 24K^{CPsV}. **B.** Vectores pAS054 y pAS059 conteniendo las versiones N- o C-terminal de la proteína reportera Citrina seguido de las versiones conteniendo las proteínas de maquinaria de *A. thaliana* o la proteína 24K^{CPsV}. ccdB: gen de la toxina CcdB utilizada como sistema de selección; attR/attB: sitios de recombinación.

Haciendo uso de bacterias de *A. tumefaciens* previamente transformadas con los vectores construidos, se realizaron expresiones transitorias en plantas de *N. benthamiana*. Como controles negativos se utilizaron los vectores vacíos, llevando solo los fragmentos N- o C-terminal de la proteína reportera (Figura 40). A su vez, en algunos ensayos se co-infiltró con la proteína Fibrilarina:mRFP

como control de expresión y en todos los casos con la proteína supresora p19. A los 3-4 dpa, se llevaron a cabo observaciones al microscopio confocal de fluorescencia. Las Figuras 41-42 muestran los resultados obtenidos. La aparición de fluorescencia verde-amarilla en las muestras co-infiltradas con los fragmentos N y C fusionados indica complementación y por lo tanto la interacción entre las dos proteínas ensayadas. La ausencia de fluorescencia de este color, indica falta de interacción.

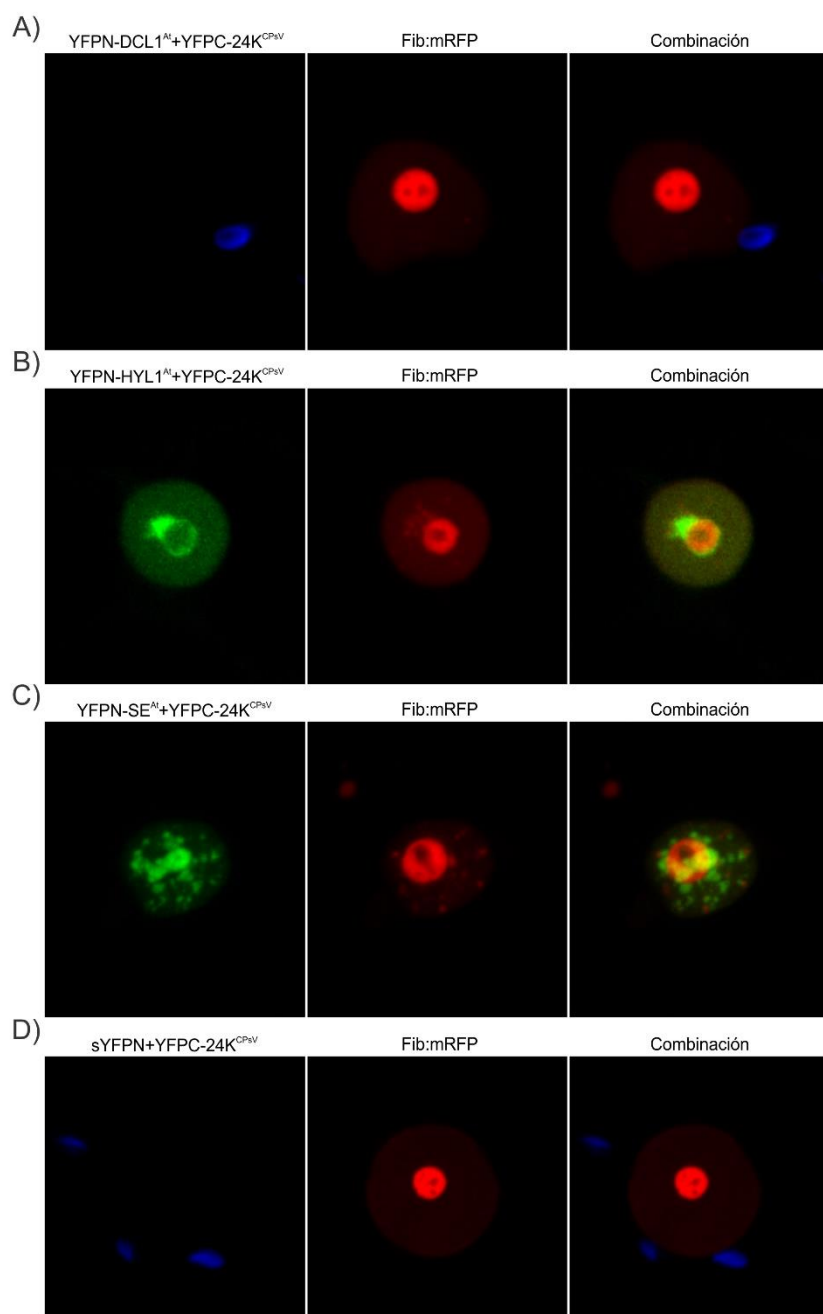


Figura 41: Análisis *in vivo* de la interacción entre la proteína 24K^{CPsV} con proteínas de la maquinaria de procesamiento de miARNs mediante ensayos de BiFC. Se indican los resultados para las interacciones: **A.** 24K^{CPsV}-DCL1^{At}, **B.** 24K^{CPsV}-HYL1^{At}, **C.** 24K^{CPsV}-SE^{At}, y **D.** 24K^{CPsV}-sYFPN (control vector vacío). Para el caso de las interacciones negativas, se marcaron en azul los cloroplastos. En todos los casos, se utilizó la Fibrilarina:mRFP como control de expresión en las muestras infiltradas.

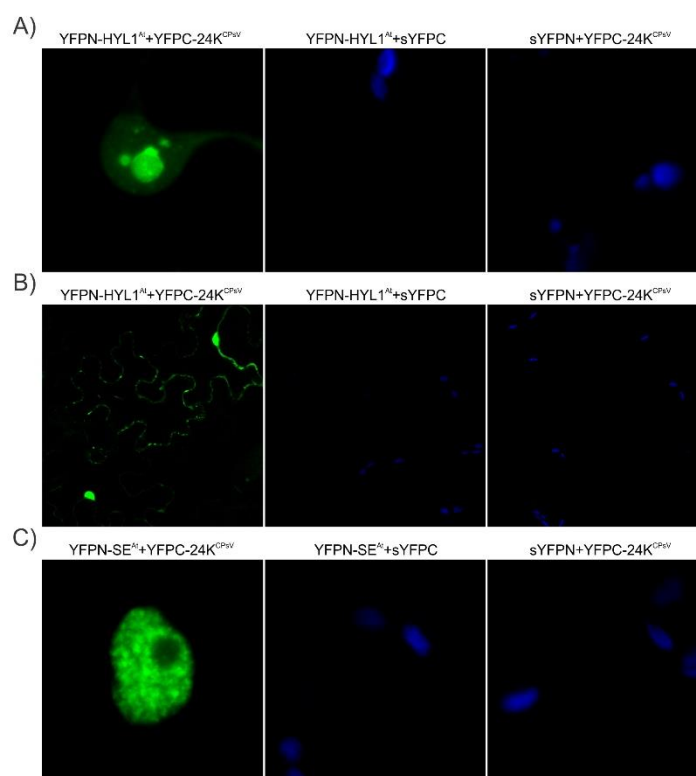


Figura 42: Análisis *in vivo* de la interacción entre la proteína 24K^{CPsV} con HYL1^{At} o con SE^{At} mediante BiFC. Se indican los resultados para las interacciones: **A.** 24K^{CPsV}-HYL1^{At} en el núcleo, en ausencia de la proteína fibrilarina, **B.** 24K^{CPsV}-HYL1^{At} en el citoplasma. **C.** 24K^{CPsV}-SE^{At} en el núcleo, en ausencia de la proteína fibrilarina. YFPN-HYL1^{At}+sYFPC, YFPN-SE^{At}+sYFPC y sYFPN+YFPC-24K^{CPsV} son los controles negativos con vector vacío. Se colorearon en azul los cloroplastos para el caso de los controles negativos.

Los resultados indican que no existe interacción con la proteína DCL1 (Figura 41. A), mientras que permiten confirmar las interacciones entre la proteína 24K^{CPsV} y las proteínas HYL1^{At} y SE^{At} (Figura 41. B y C, respectivamente y Figura 42). En los ensayos en los que se co-infiltró la proteína Fibrilarina junto con HYL1^{At}, se observó que, para más del 90% de las células observadas el patrón de expresión coincidía con lo reportado por Han y colaboradores (2004) para HYL1^{At}. Es decir, encontramos la formación de un gran agregado en contacto con el nucleolo, en muchos de los casos formando una especie de anillo a su alrededor (Figura 41. B). Se observó, además, que para el caso de la proteína HYL1^{At} esta interacción se da no solo en cuerpos nucleares, sino también en el citoplasma (Figura 42. A y B, respectivamente). Cuando se co-expresa 24K^{CPsV}-HYL1^{At} sin la expresión de Fibrilarina, el patrón obtenido para la interacción se asemeja al obtenido para la proteína HYL1^{At} agroinfiltrada de manera individual, formando varios agregados en el núcleo, separados del nucleolo. Para el caso

de la interacción 24K^{CPsV}-SE^{At} sin Fibrilarina, se observa un número alto de agregados nucleares en forma de *speckles*, característicos de SE^{At} (Figura 43. C).

IV. II. D. 1. Análisis de interacción entre mutantes de la proteína 24K^{CPsV} y proteínas de la maquinaria de biogénesis de miARNs mediante BiFC.

Se contaba en el laboratorio con una serie de mutantes para la proteína 24K^{CPsV} (Figura 43) que habían sido utilizados para evaluar, mediante análisis de localización subcelular, la funcionalidad de los motivos predichos bioinformáticamente (Borniego, 2017). En el mutante 24K^{CPsV}ΔN se eliminaron los primeros 33 aminoácidos del extremo N-terminal que podrían estar involucrados en el direccionamiento subcelular de la proteína. Este mutante abarca, además, al motivo WG predicho por el servidor AGOS. En el mutante 24K^{CPsV}W¹⁵A se realizó una sustitución puntual del Triptófano 15 correspondiente al motivo WG por Alanina. Para el caso de 24K^{CPsV}ΔNES se eliminaron los aminoácidos desde la posición 156 a 170 (156-LKKLKIISSNPKE-170), que podrían ser parte de una señal de exportación nuclear. Finalmente, para el mutante 24K^{CPsV}ΔC se eliminaron los últimos 17 aminoácidos, los cuales presentan altas probabilidades de unir ARN.

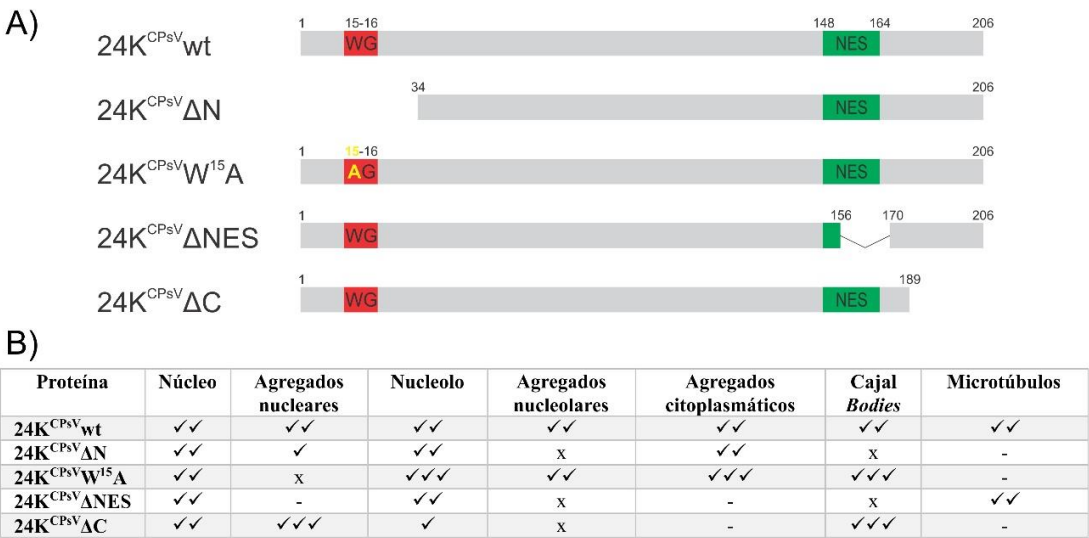


Figura 43: Mutantes de la proteína 24K^{CPsV}. A. Esquema de los mutantes. Tomado de Borniego (2017). B. Resumen de las características de localización subcelular observada mediante ensayos de expresión transitoria en plantas de *N. benthamiana*. Agregados nucleares hace referencia a agregados diferentes a los Cajal bodies. (✓✓): indica el nivel basal acumulado por la proteína 24K^{CPsV} wt; (✓): indica disminución de la acumulación; (✓✓✓): indica aumento de la acumulación; (x): indica ausencia; (-): sin evaluar.

Con la intención de identificar la región de la proteína 24K^{CPsV} participante de las interacciones observadas con las proteínas HYL1^{At} y SE^{At}, se clonaron sus versiones mutantes en los vectores de BiFC utilizados en la sección anterior (Figura 44) y se evaluó nuevamente su interacción. Las Figuras 45-48 muestran los resultados obtenidos.

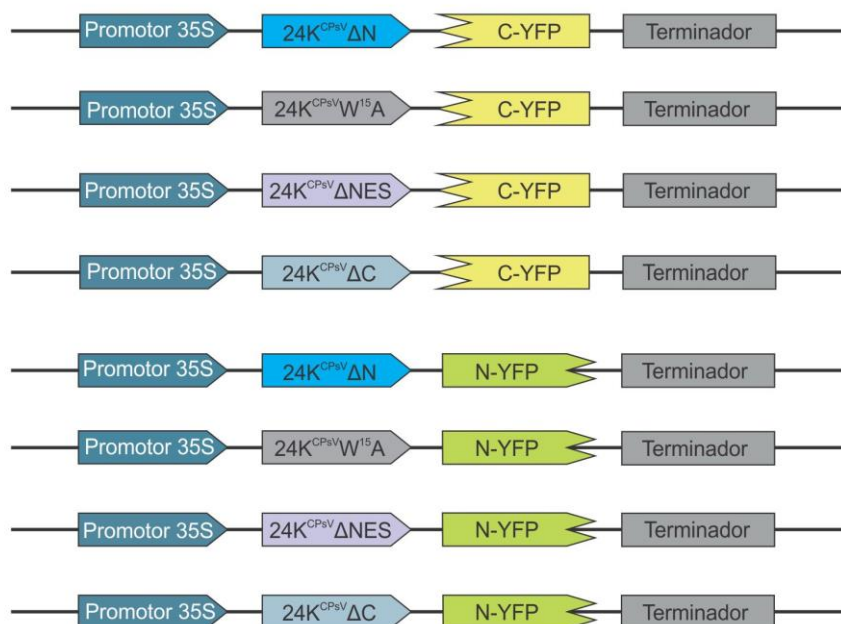


Figura 44: Representación esquemática de los vectores usados para el análisis de interacciones mediante BiFC de las versiones mutantes de 24K^{CPsV}. Las construcciones derivan de los vectores pROK2-sYFPN y pROK2-sYFPC (González *et al.*, 2010).

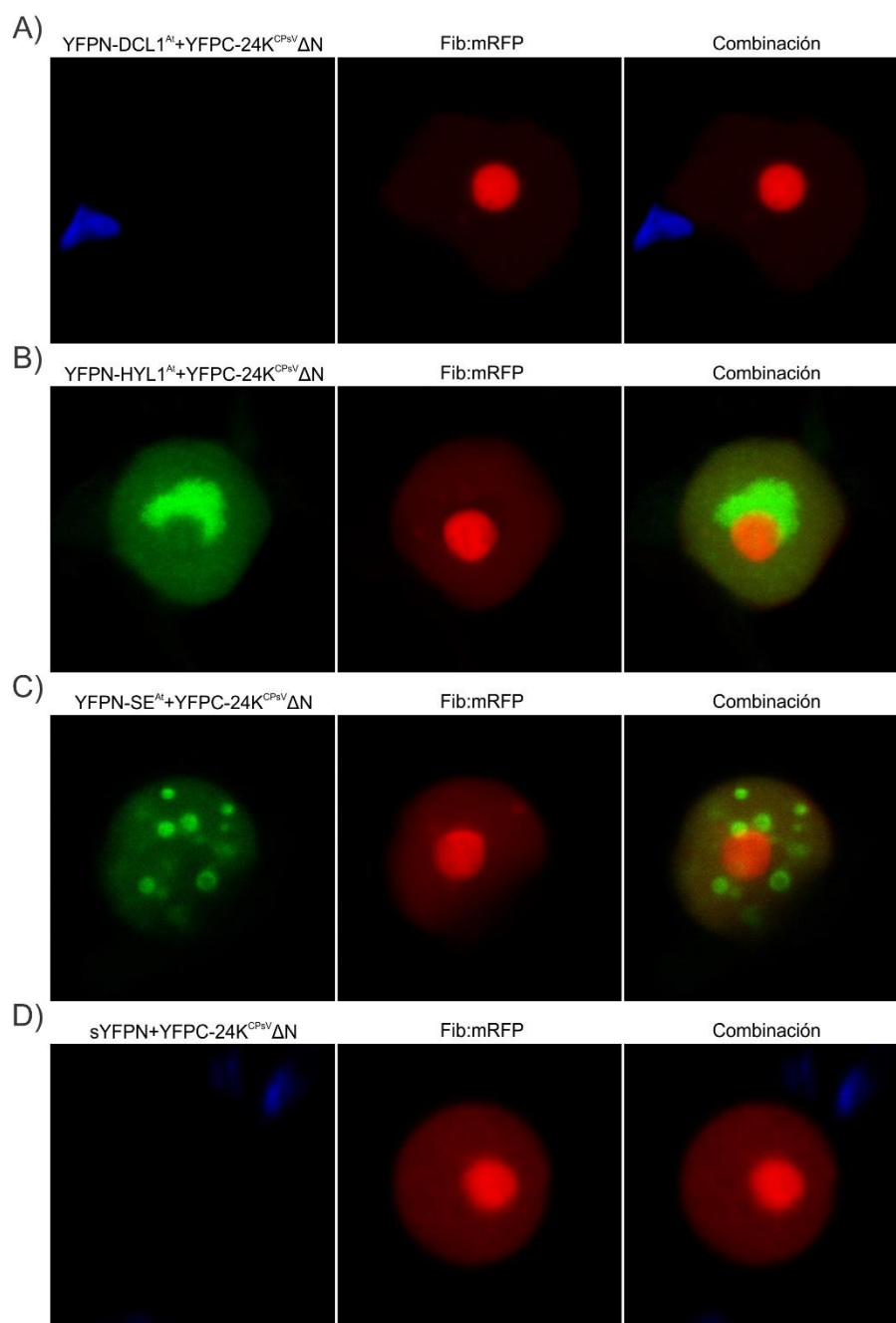


Figura 45: Análisis *in vivo* de la interacción entre la proteína mutante $24K^{CPsV\Delta N}$ con proteínas de la maquinaria de procesamiento de miARNs mediante ensayos de BiFC. Se indican los resultados para las interacciones: **A.** $24K^{CPsV\Delta N}$ -DCL1^{At}, **B.** $24K^{CPsV\Delta N}$ -HYL1^{At}, **C.** $24K^{CPsV\Delta N}$ -SE^{At}, y **D.** $24K^{CPsV\Delta N}$ -sYFPN, respectivamente. Para el caso de las interacciones negativas, se marcaron en azul los cloroplastos. En todos los casos, se utilizó la Fibrilarina:mRFP como control de expresión en las muestras infiltradas.

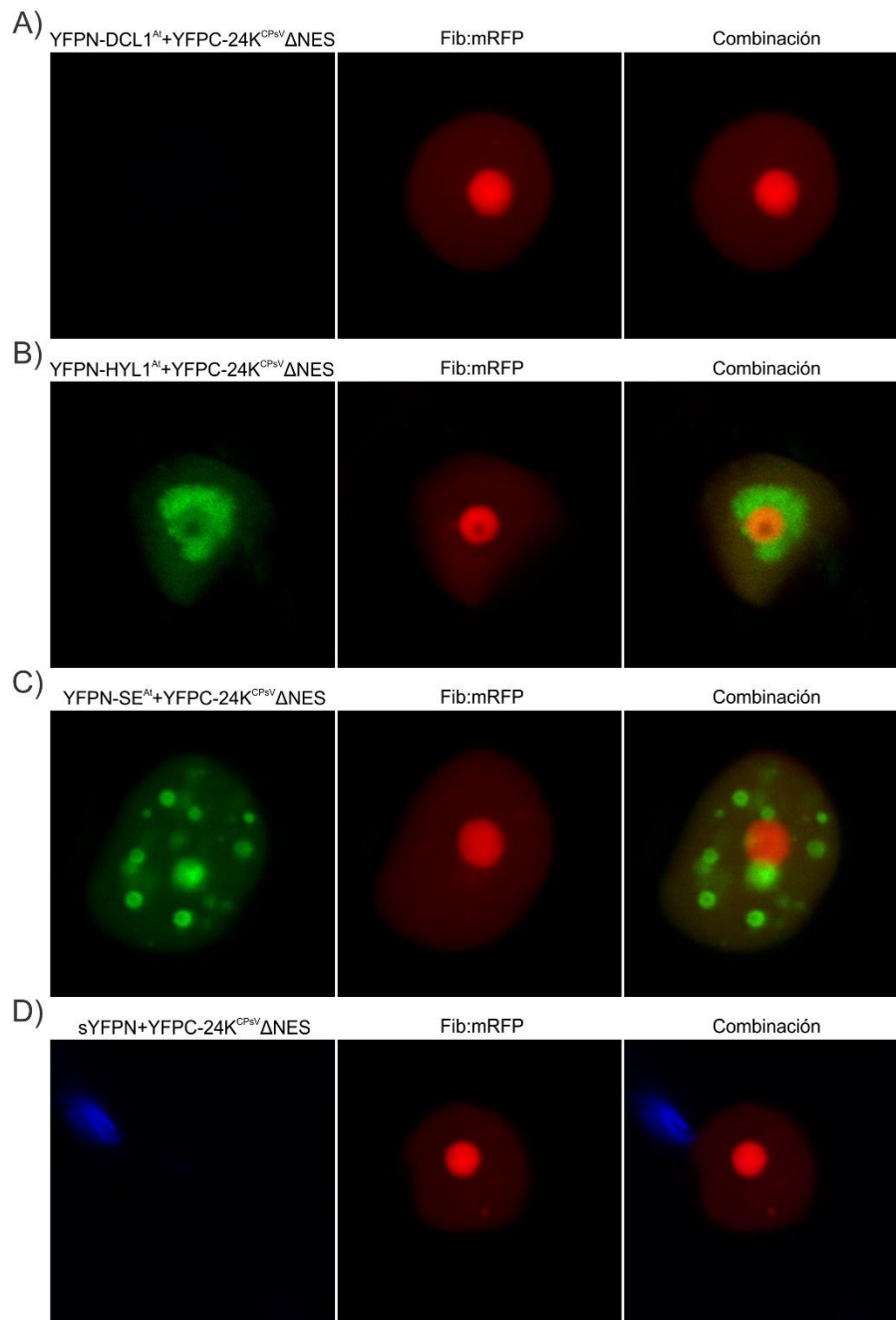


Figura 47: Análisis *in vivo* de la interacción entre la proteína mutante 24K^{CPsV}ΔNES con proteínas de la maquinaria de procesamiento de miARNs mediante ensayos de BiFC. Se indican los resultados para las interacciones: **A.** 24K^{CPsV}ΔNES-DCL1^{At}, **B.** 24K^{CPsV}ΔNES-HYL1^{At}, **C.** 24K^{CPsV}ΔNES-SE^{At}, y **D.** 24K^{CPsV}ΔNES-sYFPN, respectivamente. Para el caso de las interacciones negativas, se marcaron en azul los cloroplastos. En todos los casos, se utilizó la Fibrilarina:mRFP como control de expresión en las muestras infiltradas.

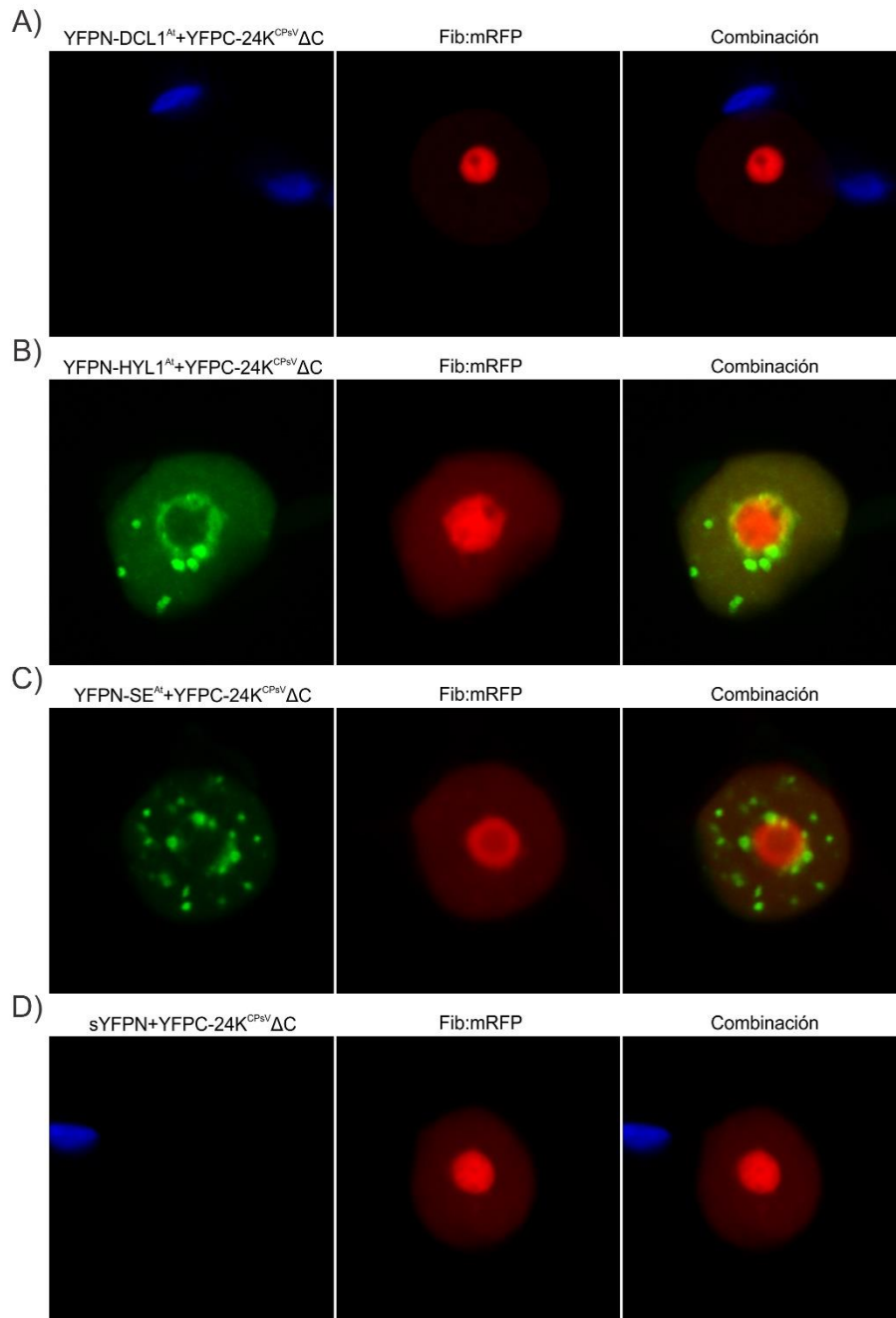


Figura 48: Análisis *in vivo* de la interacción entre la proteína mutante 24K^{CPsV}ΔC con proteínas de la maquinaria de procesamiento de miARNs mediante ensayos de BiFC. Se indican los resultados para las interacciones: **A.** 24K^{CPsV}ΔC-DCL1^{At}, **B.** 24K^{CPsV}ΔC-HYL1^{At}, **C.** 24K^{CPsV}ΔC-SE^{At}, y **D.** 24K^{CPsV}ΔC-sYFPN, respectivamente. Para el caso de las interacciones negativas, se marcaron en azul los cloroplastos. En todos los casos, se utilizó la Fibrilarina:mRFP como control de expresión en las muestras infiltradas.

Con estos resultados se puede concluir que en ninguno de los mutantes evaluados se pierde la interacción con las proteínas de maquinaria HYL1^{At} o SE^{At} (Figuras 45. B-C, 46. B-C, 47. B-C y 48. B-C). Los mutantes no mostraron interacción con DCL1^{At} al igual que ocurría con la 24K^{CPsV} *wild-type* (Figuras 45. A, 46. A, 47. A y 48. A). El patrón de localización en todos los casos fue similar al de la proteína *wild-type* a excepción de las combinaciones entre 24K^{CPsV}W^{15A} o 24K^{CPsV}ΔC con SE^{At} (Figuras 48. C y 48. C, respectivamente) Para estos casos, se observó que los agregados formados presentaban un tamaño más pequeño al resto de los mutantes evaluados y que, a su vez, un número mayor de ellos co-localizan con los agregados nucleares formados por Fibrilarina.

Discusión

En este capítulo se analizó la co-localización de la proteína 24K^{CPsV} con proteínas de la maquinaria de procesamiento de miARNs (DCL1^{At}, HYL1^{At} y SE^{At}). Se sabe que estas proteínas endógenas se unen entre sí en cuerpos específicos del núcleo de las células vegetales, los *D-bodies*, que se han propuesto como el escenario en donde se llevaría a cabo el procesamiento de los pre-miARNs (Fang y Spector, 2007). Los resultados obtenidos indican que la proteína viral co-localiza con las 3 proteínas de maquinaria evaluadas y, a su vez, se ha podido corroborar la interacción de 24K^{CPsV} con las proteínas HYL1^{At} y SE^{At} por las dos metodologías utilizadas, CoIP y BiFC. Mientras que para el caso de la proteína DCL1^{At} obtuvimos un resultado negativo en ensayos de BiFC. Si bien varios trabajos caracterizan a las proteínas involucradas en la biogénesis de miARNs, no se ha podido puntualizar el orden en que la mayoría de ellas se incorporan al complejo de procesamiento (Bologna y Voinnet, 2014; Zhang *et al.*, 2015; Achkar *et al.*, 2016). Pese a ello, se ha planteado que la proteína DCL1 es reclutada en pasos previos a la incorporación de SE y, que finalmente se incorporaría HYL1 luego de la su desfosforilación (Achkar *et al.*, 2016; Achkar *et al.*, 2018). Podría especularse entonces con que la proteína 24K^{CPsV} se una a las proteínas accesorias HYL1 y SE previamente a ser estas incorporadas al complejo ocupado por DCL1 lo cual podría explicar que la proteína viral colocalice con DCL1, pero no interaccione con ella.

Ninguno de los mutantes de la proteína 24K^{CPsV} utilizados para los ensayos de BiFC perdió la capacidad de unirse a las proteínas HYL1^{At} y SE^{At} ni interaccionó con DCL1^{At}. Si bien estos resultados sugerirían que ninguno de los dominios predichos de forma computacional estaría interfiriendo con la unión a las proteínas de maquinaria, no debe descartarse la posibilidad de que alguno de ellos pierda la capacidad de unión a pre-miARNs o alteren la interacción con AGO1, en caso de confirmarse.

Como se ha mencionado anteriormente, son escasos los reportes que relacionan a los VSRs directamente con la vía de biogénesis de miARNs. Más

precisamente, en plantas solo se ha reportado una proteína viral capaz de interferir con el núcleo procesador de miARNs y alterar su función durante la infección viral (Zheng *et al.*, 2017). En dicho trabajo, se plantea que la supresora NS3^{RSV} interacciona con DRB1 (HYL1) y con SE, pero que solamente interfiere con la función de HYL1. El modelo propuesto indica que esta proteína permite una mayor dimerización de HYL1 (necesaria para realizar correctamente la función) y, como consecuencia, genera un aumento del procesamiento de un grupo particular de pre-miARNs favoreciendo la infección viral (Zheng *et al.*, 2017). El análisis bioinformático y mutacional de la NS3^{RSV} identificó a 3 aminoácidos básicos de carga positiva (174-KKR-177) de la proteína como los responsables de la interacción con HYL1. Estos aminoácidos a su vez funcionan como sitio de unión a ARN de la proteína y se encuentran dentro de una NLS predicha por el *software* PSORT.

A partir de estos resultados, se decidió realizar un alineamiento de la NS3^{RSV} con la proteína 24K^{CPsV} de manera de localizar la región de interés en la proteína de CPsV (Figura 49).

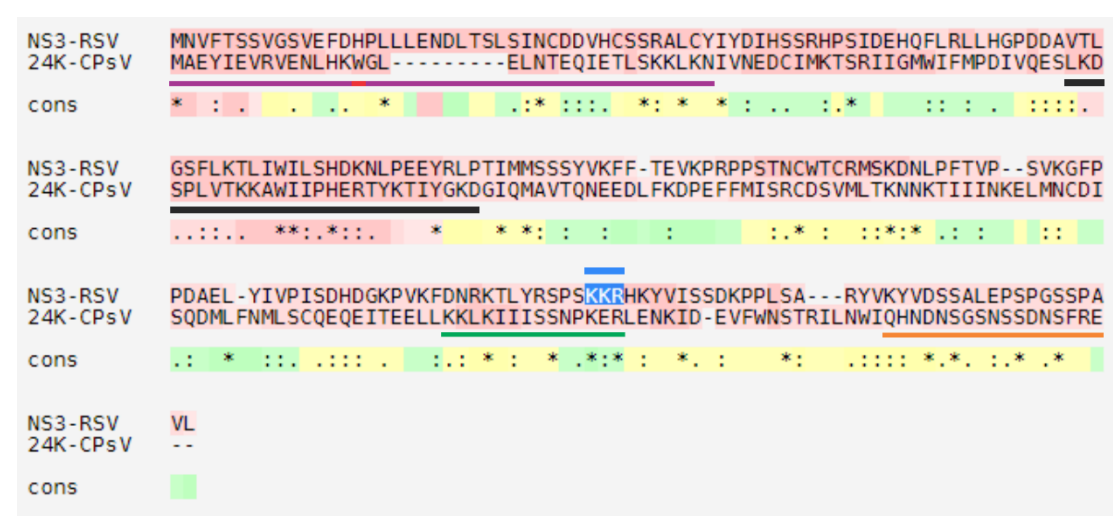


Figura 49: Alineamiento aminoacídico entre las proteínas 24K^{CPsV} y NS3^{RSV}. Haciendo uso del servidor Psi-Coffee (Di Tommaso *et al.*, 2011; Taly *et al.*, 2011) se realizó un alineamiento entre las proteínas virales. Se resaltan en celeste los aminoácidos de la proteína NS3^{RSV} que interactúan con HYL1, mientras que se subraya en negro la región rica en aminoácidos básicos (K, R, H) de la proteína 24K^{CPsV}. Además, se subraya en color violeta la región eliminada en el mutante 24K^{CPsV} Δ N que comprende al mutante puntual 24K^{CPsV}W¹⁵A (en rojo), en color verde se subraya el segmento eliminado en el mutante 24K^{CPsV} Δ NES, mientras que en naranja el eliminado para el caso de 24K^{CPsV} Δ C.

La región responsable de la interacción de NS3^{RSV} con HYL1 identificada por este alineamiento se ubicó sobre la zona eliminada en el mutante 24K^{CPsV} Δ NES, el cual demostró no interferir en la interacción con las proteínas de maquinarias

HYL1^{At} y SE^{At}. Sin embargo, se identificaron residuos de carga positiva sobre el centro de la secuencia de 24K^{CPsV}. Esta región no ha sido modificada en ninguno de los mutantes existentes y podría plantearse como un posible sitio a mutar de manera de caracterizar las interacciones de la 24K^{CPsV} descritas en este Capítulo.



DISCUSIÓN GENERAL

Discusión general

Los ensayos realizados en este trabajo de Tesis, tuvieron como objetivo profundizar en el conocimiento del mecanismo de acción de la proteína 24K^{CPsV} como VSR, específicamente en relación a la vía de silenciamiento mediada por miARNs y su relación con la expresión de síntomas. A su vez, pretendieron determinar y caracterizar los mecanismos de procesamiento de un grupo de pre-miARNs en plantas de naranjo dulce, evaluar su acumulación y la de los *targets* regulados por los miARNs maduros correspondientes.

De los 10 miARNs evaluados por Reyes y colaboradores (2016) en plantas de naranjo infectadas con dos aislamientos de CPsV, 7 disminuyen su acumulación con la presencia viral (miR156, miR167, miR169, miR171, miR172, miR393, miR403), mientras que los 3 restantes (miR164, miR166, miR390) no se vieron alterados. Con el objetivo de encontrar características comunes en el grupo de miARN afectado, analizamos en el Capítulo 1 las familias de sus pre-miARNs a nivel de secuencia y estructura.

El análisis de secuencia de los pre-miARNs reveló una gran variabilidad nucleotídica entre los integrantes de cada una de las familias estudiadas. Pese a ello, 8 de las 10 familias nos permitieron inferir un posible mecanismo de procesamiento, a excepción de las familias de los pre-miR164 y pre-miR166, cuya secuencia consenso demostró contener una variabilidad muy alta por fuera de las regiones correspondientes al miARN o miARN*. Esto impidió la identificación de posibles determinantes estructurales a partir de su secuencia. Si bien resulta una asociación compleja, tanto el miR164 como el miR166 no mostraron alteración en muestras de naranjo infectadas por CPsV, por lo que podría especularse con que la mayor variabilidad en la secuencia de estos pre-miARNs de alguna forma permite la evasión al efecto causado por la infección viral.

El análisis de las estructuras secundarias de los pre-miARNs nos permitió la identificación de determinantes estructurales previamente caracterizados en

plantas modelo (Bologna *et al.*, 2013b; Chorosteki *et al.*, 2017; Moro *et al.*, 2018). Se predijeron procesamientos tanto en sentido *base to loop* como *loop to base* para el grupo que mostró alteraciones por CPsV y para el grupo que no lo hizo. Por lo tanto, resulta difícil encontrar una asociación con el mecanismo de procesamiento que nos permita explicar los cambios observados en los miARNs alterados.

En la Figura 50 se esquematizan los pasos en la biogénesis y en la fase efectora del silenciamiento mediado por miARNs en los que estaría involucrada la proteína 24K^{CPsV}, basándonos en las evidencias experimentales encontradas en este trabajo de Tesis.

Los resultados reportados por Reyes *et al.* (2016) indicaron que la infección viral no modifica los niveles de transcripto primario (pri-miARN) para el caso del miR156a, pero sí disminuye la acumulación del miR156a maduro. Mediante el análisis de cuantificación de pre-miARNs llevado a cabo en el Capítulo 2, comprobamos que su acumulación se ve aumentada en muestras infectadas respecto a los controles sin infectar. Esto nos permitió proponer una alteración en el procesamiento de los miARNs lo cual podría estar relacionado con una interferencia a nivel de la maquinaria de biogénesis de los mismos (Figura 50). Esta acumulación aumentada de pre-miARNs sin procesar se observó también para el resto de los precursores de los miARNs alterados en muestras infectadas (Reyes *et al.*, 2016), por lo que podría postularse un mecanismo general para ellos.

Varios reportes realizados en *A. thaliana* describen comportamientos similares para el caso de mutantes en las proteínas HYL1 o SE, donde se observan cantidades disminuidas de las especies maduras de miARNs, y un aumento de los correspondientes pre-miARNs sin procesar (Han *et al.*, 2004; Vázquez *et al.*, 2004; Lobbes *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006; Laubinger *et al.*, 2008). Se reportó que miARNs particulares demostraban mayor o menor dependencia de estas proteínas accesorias, provocando una mayor alteración para algunos de ellos (Han *et al.*, 2004; Vázquez *et al.*, 2004; Lobbes *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006; Laubinger *et al.*, 2008; Achkar *et al.*, 2018). En ese sentido, mediante

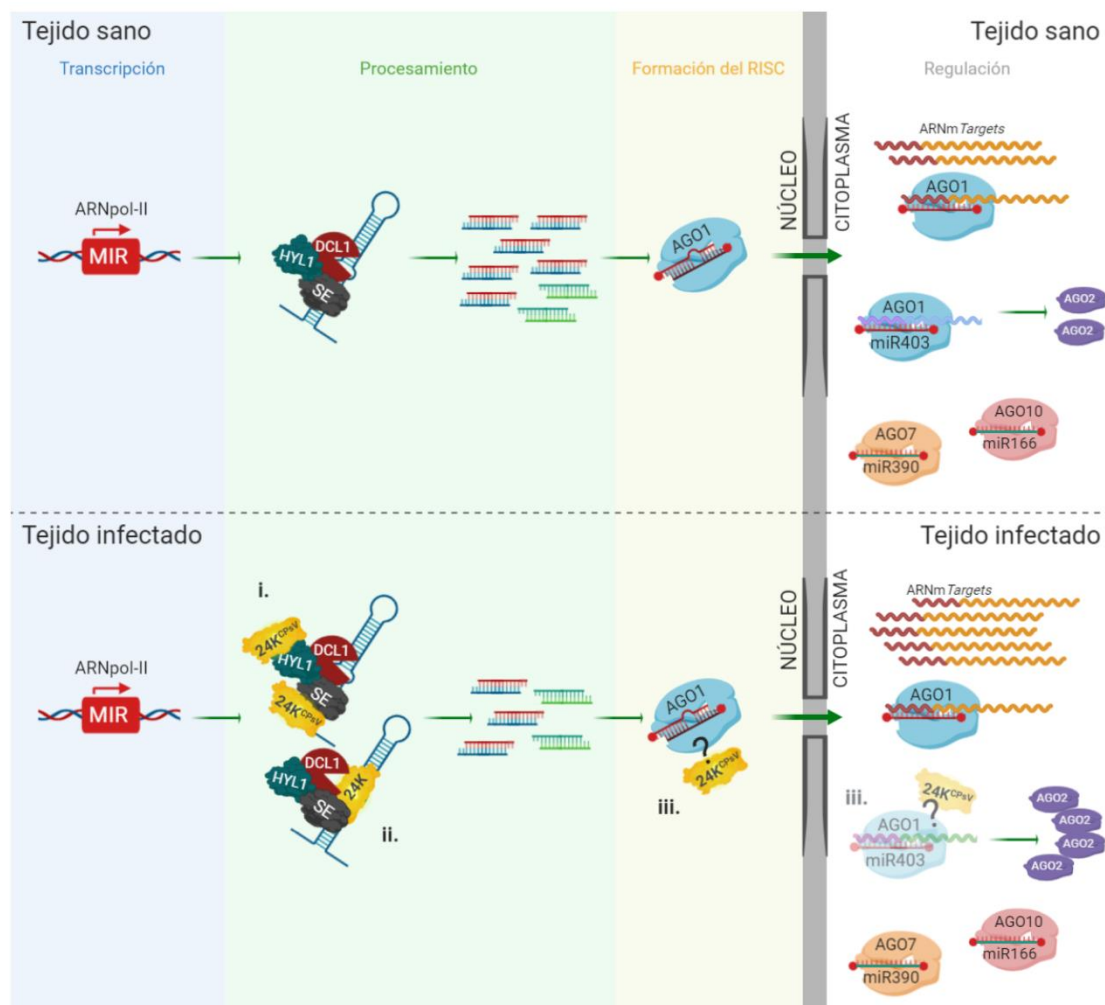


Figura 50: Alteraciones propuestas en la biogénesis y fase efectora del silenciamiento mediado por miARNs provocadas por la proteína 24K^{CPsV}. La parte superior representa las condiciones de tejido sano, en donde los genes MIR se transcriben por la ARNpol-II en el núcleo (sector celeste), dando como resultado un pre-miARN que será procesado por la endoribonucleasa DCL1 y sus proteínas accesorias HYL1 y SE para liberar el dúplex miARN/miARN* (sector verde). Este dúplex será metilado en los extremos 3' y, seguidamente, cargado en la proteína AGO1 para formar el complejo RISC (sector amarillo). Una vez en el citoplasma, el RISC reconocerá el transcripto *target* por complementariedad de bases con la secuencia del miARN cargado y llevará a cabo su función reguladora o efectora, ya sea por degradación del transcripto o inhibición de la traducción. Se ejemplifica el caso particular del miR403, para el cual se ha verificado su acción reguladora sobre el transcripto de la proteína AGO2. Se muestran, además, los miR166 y miR390 caracterizados por unirse a AGO10 y AGO7, respectivamente en lugar de AGO1 (sector blanco).

En la parte inferior se representa el escenario propuesto para una célula vegetal infectada con el virus CPsV. Luego de ser transcritos los genes MIR (sector celeste), la proteína 24K^{CPsV} interactuaría con los pre-miARNs y con las proteínas accesorias de la maquinaria de biogénesis (HYL1 y SE), generando una alteración en el procesamiento de los pre-miARNs y dando como resultado una menor producción de miARN/miARN* (sector verde). Estos dúplex se cargarán en AGO1 para formar el complejo RISC del silenciamiento (sector amarillo) pero llevarán a una menor degradación (mayor acumulación) de transcritos *targets*. Algunas evidencias sugieren que la proteína 24K^{CPsV} podría también interactuar con AGO1. De esta manera también habría una mayor acumulación de *targets* que podrán ser traducidos (por ejemplo, el de la proteína AGO2). Las vías de los miR166 y miR390 no se verían alterados por la presencia viral (sector blanco).

Se representan en verde los miARNs maduros no alterados por la infección y en rojo los que sí se alteran.

ensayos de CoIP y BiFC, corroboramos que la proteína 24K^{CPsV} interactúa con las proteínas HYL1^{At} y SE^{At} en el núcleo (Figura 50. i), pudiendo ser responsable de una alteración en el funcionamiento de las mismas, y por consiguiente

provocar un procesamiento defectuoso por parte de DCL1 que afecte en mayor manera al grupo de miARNs con más dependencia de las proteínas accesorias. A su vez, también se observó interacción con HYL1^{At} a nivel de citoplasma, con lo cual se podría especular con un posible secuestro de HYL1^{At} por 24K^{CPsV} provocando que su acumulación nuclear disminuya.

La interacción de 24K^{CPsV} con HYL1^{At} representaría el segundo caso de VSRs con esta capacidad reportado en plantas. Sin embargo, al contrario de lo que describe Zheng y colaboradores (2017) para la proteína NS3^{RSV}, la proteína 24K^{CPsV} estaría provocando una disminución de los miARNs maduros y no una aceleración en el procesamiento. Para el caso de la NS3^{RSV} se propone que la proteína unida al pri-miARN interactúa con HYL1 facilitando su dimerización y regulando su interacción con los pri-miARNs a los que se une. Podría sugerirse un efecto opuesto para la proteína 24K^{CPsV} impidiendo la dimerización de HYL1 e incluso secuestrando, en este caso, los pre-miARNs.

Mediante los ensayos de RIP realizados en plantas de *N. benthamiana* y descritos en el Capítulo 2, se demostró además que la proteína 24K^{CPsV} interacciona con los pre-miARNs evaluados. Sumado a ello, estudios previos de nuestro laboratorio indicaron que esta proteína viral tiene la capacidad de interaccionar con ARNdh largos *in vitro* (Robles Luna *et al.*, 2017) lo que permitiría pensar en una interacción directa con los pre-miARNs *in planta* (Figura 50. ii).

Tras su liberación por parte de la maquinaria de procesamiento, los miARNs se cargan en el complejo RISC para llevar a cabo su función efectora. Si bien la proteína AGO1 es el actor principal en la regulación mediada por miARNs, otros miembros de la familia AGO pueden cargar miARNs en los complejos RISC (Mi *et al.*, 2008; Montgomery *et al.*, 2008a; Zhu *et al.*, 2011). Se ha informado, por ejemplo, que los miembros de la familia miR165/166 se asocian con AGO10 a pesar de presentar un extremo 5'U el cual los relacionaría con AGO1 (Zhu *et al.*, 2011). Por su parte, se ha reportado que el miR390 se asocia específicamente con AGO7 y en algunos casos con AGO2 (Mi *et al.*, 2008; Montgomery *et al.*, 2008a). En relación a AGO1, además, se ha reportado que, en mutantes

deficientes de la proteína, ciertos miARNs disminuyen su acumulación respecto a plantas *wild-type*, infiriendo que AGO1 es importante para la estabilidad de los miARNs (Vaucheret *et al.*, 2004; Vaucheret *et al.*, 2006). A su vez, Vaucheret y colaboradores (2004), proponen una posible función de AGO1 en la generación de los miARNs.

A partir de estas evidencias y considerando la presencia del motivo GW/WG en la proteína 24K^{CPsV} se podría proponer una posible interacción de la misma con AGO1 (Figura 50. iii). Esto llevaría a la disminución solamente de aquellos miARNs que se cargan en AGO1 mientras que aquellos que regularmente puedan estabilizarse en otras AGOs, como el miR166 y miR390, permanecerían inalterados.

Por último, en el Capítulo 3 se predijeron bioinformáticamente los transcriptos *targets* para 4 de los miARNs estudiados, los cuales fueron validados mediante análisis de degradoma. A su vez, se evaluó su acumulación en muestras infectadas respecto de muestras sanas. Las funciones biológicas de dicho grupo comprenden a FTs y proteínas de unión a ácidos nucleicos y/o proteínas. En resumen, la infección por CPsV generó una acumulación aumentada en 8 de los 10 *targets* predichos, 6 de los cuales fueron validados mediante el análisis de degradoma. Ya se había comprobado este mismo comportamiento para otros 3 *targets* del grupo de los 7 afectados por la infección (Reyes *et al.*, 2016). El aumento del grupo de *targets* evaluado fue en general significativamente mayor en las muestras que presentan la sintomatología de *shock* respecto de las que presentan la sintomatología más leve de *flecking*. Entre los *targets* validados en este trabajo se destaca la proteína AGO2, que proporciona un mecanismo antiviral secundario en aquellas condiciones en donde la actividad de AGO1 se ve comprometida, por ejemplo, por acciones de supresoras virales (Harvey *et al.*, 2011). En condiciones normales, esta función de AGO2 no se observa debido a una regulación negativa ejercida por AGO1 por medio del miR403 (Allen *et al.*, 2005). Nuestros resultados demuestran un aumento de AGO2 en las muestras infectadas que presentan la sintomatología de *shock* respecto del control sano. Un posible efecto inhibitorio del virus sobre AGO1, como podría ser la interacción anteriormente propuesta con la proteína 24K^{CPsV}, podría también explicar la inducción de AGO2 (Figura 50. iii).

La alteración en la biogénesis de miARN reportada en el presente trabajo no nos permite describir de forma directa un mecanismo de evasión por parte del virus al silenciamiento de la planta que favorezca la replicación del mismo, como generalmente se describe para las VSRs reportadas. Sin embargo, de la cuantificación tanto de pre-miARNs como de *targets* en muestras infectadas respecto de sanas, se desprende una correlación entre las alteraciones provocadas por el virus y la severidad de la sintomatología observada. Por lo tanto, proponemos que la modificación de los mecanismos de biogénesis de miARNs provocada por CPsV conduciría a una desregulación de algunos genes responsables de la expresión de síntomas.

En este sentido, podríamos mencionar el ejemplo de los genes SPL (*Squamosa promoter-binding protein-like*) regulados por el miR156 para los que hemos visto alteración en muestras de *C. sinensis* infectadas con CPsV (Reyes *et al.*, 2016). Se ha informado que dichos factores de transcripción desempeñan un rol regulatorio en la defensa de *A. thaliana* frente al patógeno *Pseudomonas syringae*, similar a lo observado en *N. benthamiana* frente a infecciones con TMV (Cui *et al.*, 2014). Los SPL parecerían estar implicados en la transcripción de genes clave de respuesta inmune involucrados en la inducción de la respuesta hipersensible y la muerte celular programada (HR-PCD) (Padmanabhan *et al.*, 2013). Resultaría entonces razonable asociarlos con la sintomatología de necrosis que se observa en el *shock*. Por otro lado, se ha implicado a los SCL (*Scarecrow-like*), *targets* de miR171, en la regulación de la síntesis de clorofila en respuesta a la luz (Ma *et al.*, 2014). En dicho trabajo se plantea que la luz promueve la expresión del miR171 y un decaimiento concomitante del *target* SCL, incrementado la síntesis de clorofila (Ma *et al.*, 2014). Reyes y colaboradores (2016) reportó una disminución del miR171 durante la infección por CPsV, y un aumento del SCL6 evaluado respecto de muestras sanas. Este aumento de SCL6 podría provocar una disminución de la clorofila en las plantas de *C. sinensis* infectadas, contribuyendo a la clorosis observada en las hojas. Seguramente muchos otros *targets* que aún no hemos caracterizado estarán involucrados en estas vías que llevan a la sintomatología de CPsV en plantas de naranjo dulce.



PERSPECTIVAS

Perspectivas

- Analizar la acumulación de los pre-miARNs mediante RT-qPCR de los 3 miARNs que no mostraron alteración por la infección con CPsV (miR164, miR166 y miR390) en los reportes de Reyes y colaboradores (2016).
- Repetir los ensayos de CoIP para evaluar la interacción entre las proteínas DCL1^{At} y la proteína 24K^{CPsV}. Para esto se plantea modificar las condiciones del ensayo (modificar condiciones de extracción, no realizar fijación con formaldehído, y realizar a la par el ensayo sin purificar núcleos) de manera de que DCL1^{At} precipite eficientemente. De esta forma, se podrá confirmar que no existe interacción entre ambas en concordancia con los ensayos de BiFC.
- Evaluar la co-localización y posible interacción entre la proteína 24K^{CPsV} y la proteína AGO1^{At}, para lo cual ya se cuenta con las construcciones necesarias.
- Evaluar la capacidad de los mutantes de 24K^{CPsV} de unir pre-miARNs mediante la técnica de RIP, con principal atención en el mutante 24K^{CPsV}ΔC donde se eliminan los aminoácidos con capacidad de unión a RNA predichos por Pprint. Ya que este mutante no pierde la interacción con HYL1 ni SE, la pérdida de unión a pre-miARNs mediante RIP nos estaría confirmando que la proteína 24K^{CPsV} se uniría directamente a los pre-miARNs.
- Generar nuevos mutantes sobre la secuencia de 24K^{CPsV} que nos permitan la pérdida de interacción con las proteínas de maquinaria (HYL1^{At} o SE^{At}) y/o con los pre-miARNs. En este sentido, existe una región con muchos residuos básicos (K-R-H) entre las posiciones 62-LKDSPLVTKKAWIIPHERTYKTIYGKD-88, las cuales se reemplazarán de forma puntual por residuos de Alanina y se analizará su comportamiento.

- Generar mutantes sobre las posiciones 54-MP-55 de 24K^{CPsV} pertenecientes al motivo F-box predicho, y evaluar su funcionalidad. En caso de ser funcional, la proteína 24K^{CPsV} podría estar generando un mecanismo similar al de la proteína P0 de poliovirus, provocando la degradación de AGO1.
- Secuenciar bibliotecas del tipo SPARE (Bologna *et al.*, 2013b; Moro *et al.*, 2019) para analizar los intermediarios de procesamiento que se generan en *C. sinensis* para las familias de pre-miARNs del miR156, miR171 y miR403 en plantas infectadas con el aislamiento 90-1-1 y plantas sanas. Las bibliotecas fueron construidas durante este trabajo de Tesis y han sido enviadas para su secuenciación. Esto nos permitirá confirmar el tipo de procesamiento de los pre-miARNs y evidenciar posibles efectos de imprecisiones o corrimientos en los sitios de corte realizados por DCL1 debidos a la interacción de 24K^{CPsV} con HYL1 y SE.
- Estudiar el interactoma de la proteína 24K^{CPsV} mediante la metodología de TAP (*Tandem Affinity Purification*), para lo cual ya se ha generado durante este trabajo de Tesis la construcción 35S:24K^{CPsV}-HA-Flag. Se utilizará el sistema *FLAG® HA Tandem Affinity Purification Kit* (Sigma, USA). Los resultados de estos estudios permitirán ampliar la información respecto de otras interacciones con proteínas de la vía de procesamiento de miARN e identificar otras vías en las cuales la proteína estuviera implicada.
- Caracterizar *in vitro* la interacción de la proteína 24K^{CPsV} purificada (y/o sus mutantes) con pre-miARNs sintéticos específicos mediante ensayos de retardo de movilidad en gel (EMSA).
- Aplicar la técnica de FLIM (*Fluorescence lifetime imaging microscopy*) para medir la proximidad de las moléculas de 24K^{CPsV} (wt y mutantes) con las proteínas de maquinaria mediante FRET (*Fluorescence resonance energy transfer*). De esta manera se podrá caracterizar las interacciones y compararlas entre ellas.



MATERIALES Y MÉTODOS

V. Materiales y Métodos

V. I. Materiales y Métodos

V. I. A. Reactivos químicos

Durante el desarrollo de este trabajo se usaron reactivos de grado analítico de Merck (Darmstadt, Alemania), Sigma (St. Louis, EE.UU.), Fluka (Buchs, Suiza), Carlo Erba (Milán, Italia). Las drogas y enzimas empleadas en los experimentos de Ingeniería genética fueron de grado Biología Molecular de: Sigma (St. Louis, EE.UU.), Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania), EURx (Gdańsk, Poland), Promega (Madison, EE.UU.), New England Biolabs, NEB (Beverly, EE.UU.), Gibco BRL (Gaithersburg, EE.UU.), PIERCE (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois EEUU). Kits de clonado de Thermo Fisher Scientific (USA), y de co-inmunoprecipitación (Chromotek, Alemania).

V. II. B. Cepas bacterianas

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron las cepas bacterianas de *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) detalladas a continuación.

- *E. coli*:

- DH5 α F': supE44 Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1.

- TOP10: F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG λ -.

- DB3.1: gyrA462 endA1 Δ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20 glnV44 (=supE44) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 xyl5 leuB6 mtl1.

- *A. tumefaciens*:

- GV3101::pMP90: con resistencia a Rifampicina en el genoma y Gentamicina en el plásmido Ti, pTiC58ΔT-DNA.

- EHA105: es una cepa de *A. tumefaciens* Kms derivada de la EHA101 (Hood *et al.*, 1993). EHA101: genotipo C58 pTiBo542; T-region::aph, Km^R; cepa desarmada derivada de *A. tumefaciens* A281, el T-DNA reemplazado con nptII, eliminación de extremos del TDNA no confirmado, supervirulenta (Hood *et al.*, 1986).

- C58-C1CH32: cepa desarmada de *A. tumefaciens* (pTiB6S3ΔT-DNA) (Deblaere *et al.*, 1985) que contiene un plásmido auxiliar pCH32 (Hamilton, 1997); Rif^R, Tet^R.

V. I. C. Genomas

Las secuencias de *C. sinensis* utilizadas en este trabajo fueron extraídas de la base de datos: <http://citrus.hzau.edu.cn/orange/> . En algunos casos, utilizamos las secuencias de los sitios https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Csinensis y <https://www.citrusgenomedb.org/species/sinensis/genome1.0> para complementar información.

V. I. D. Secuencias aminoacídicas de las proteínas virales de ophiovirus que se utilizaron en los análisis bioinformáticos

```
>gi|50355590|ref|YP_053237.1| 22 kDa protein [Lettuce ring  
necrosis virus]  
MDLLENATQGTESNCEQGKVLNLLKASGHILTEYTLHEKKVVERNSHEYQKLMKYKTSYTE  
EGRFLFGSWLLTSDKVPRIFDKKAVIIIKTLNSFVDVLYDDIFISLTQKICDIFTSLFFQ  
LYKVDAMISFGDKKIYRLENGYTI PHYSMILSKEEERSKRNLLENALRTLSDNEKKCDSTC  
SLSVSTMKHF
```

```
>gi|663441663|gb|AIF28242.1| 23 kDa protein [Blueberry mosaic  
associated virus]  
MQVCDRNNRKDRSFKRYKLSSKELINIKINDKLFETEEKFMKYNHGIETKRCLFGLWMMF  
ESSNCNSYIFRKKGVIFLSKEHDVHMTSYFDDIEICICNEKFELLSYNNLTGDMIFKV
```

PNHNLYELYAHDDKKKENTLFSMLEESEKTKYTELKRKSLVIHDEKRKFFSAQSSFKDA
ETSSGIRDPVE

>gi|30059153|gb|AA034633.1| **24 kDa protein** [Citrus psorosis virus]
MAEYIEVRVENLHKWGLELNTEQIETLSKKLKNIVNEDCIMKTSRIIGMWIFMPDIVQESL
KDSPLVTKKAWIIPHERTYKTIYGKDGIQMAVTQNEEDLFDKDEFFMISRCDVMLTKNNK
TIIINKELMNCDISQDMLFNMLSCQEIQEITEELLKKLKIIISSNPKERLENKIDVFWNST
RILNWIQHNDNSGNSSDNSFRE

>25kDa protein [Mirafiori lettuce big-vein virus-isolate LP2]
MSQFKDKSILKSNEVPPEEMFTCISGSTDNGEMKTVISKGNEEKSLMKTKNKVNRIQLFL
NYHVKEPLIMDHSAERNSEMMKTMRYKTSYREVTRFLIGSWLLFAEKLIPPFNMKAI
IETDQKLVDVADFEGIEILLGNNIQSCLDSEFYMRFYKEDLILYNTANELLLLIDNFKIPKY
FAKLDMNQVRLKKIIEKKYISLIKAGKL

V. I. E. Aislamientos de CPsV

Se utilizaron dos aislamientos de Citrus psorosis virus (CPsV) como fuentes de inóculo para la obtención de muestras infectadas de naranjo dulce. Por un lado, el aislamiento CPV-4 de Florida (USA), que fue aislado de Texas (USA) (Garnsey y Timmer, 1980). Por otra parte, el aislamiento argentino 90-1-1 proveniente de la región mesopotámica obtenido en la Estación Experimental Agropecuaria INTA–Concordia, Entre Ríos, Argentina (Martin *et al.*, 2006; Reyes *et al.*, 2009).

V. I. F. Vectores de clonado

- pCR8GW/TOPO, Thermo Fisher Scientific (USA).
- pGEM-T, Promega (Madison, USA)
- pBluescript KS+, Stratagene (California, USA)

V. I. G. Plásmidos binarios

- pB7RWG2.0 para el desarrollo de fusiones traduccionales a RFP (Karimi *et al.*, 2002). Cedidos gentilmente por División de Genómica funcional del Departamento de Biología de sistemas de plantas (VIB Ghent University).

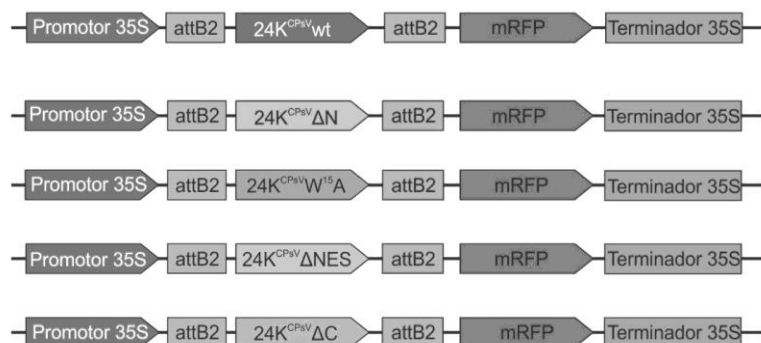


Figura 51: Esquema de los vectores pB7:24K^{CPsV}.mRFP (*wt* o mutantes) generados.

- pBin61-P19: para expresión in planta de la proteína supresora del silenciamiento génico P19 (Voinnet *et al.*, 2003).
- pGDG: para la expresión de GFP citosólicas (Goodin *et al.*, 2002).
- pRFP: para la expresión de la proteína mRFP libre (Robles Luna *et al.*, 2013).
- pROK.2: para la expresión en planta de fibrilarina fusionada en su extremo C-terminal a mRFP (Kim *et al.*, 2007b). También se utilizaron versiones modificadas de este plásmido para los ensayos de BiFC de las proteínas virales (González *et al.*, 2010)
- pCAMBIA1300: portando las secuencias para la expresión de las proteínas de maquinaria de procesamiento de miARNs DICER LIKE 1 (EC10883; pCAMBIA1300:

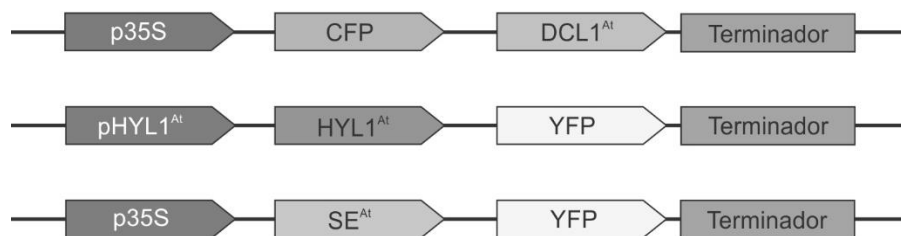


Figura 52: Esquema de los vectores portando a las proteínas de maquinaria de *A. thaliana*. Fang y Spector, (2007)

35S:CFP-DCL1), HYPONASTIC LIKE 1 (EC10887; pCAMBIA1300: pHYL:HYL1-YFP) y SERRATE (EC10887; pCAMBIA1300: 35S:SE-YFP) de *A. thaliana* (Fang y Spector, 2007).

V. I. H. Cebadores

A continuación, se muestran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados durante este trabajo.

Nombre	Secuencia 5' --> 3'
24Ks	ATGGCTGAATATATAGAAG
24Kas	CTCGCGGAAAGAATTGTCTG
24Kf	ATATATAGAAGTAAGAGTTGAAAATTTACA
24KF-BamH1	GCGGATCCACAATGGCTGAATATATAGAAG
RFP-R-SamI	GCGGGCCCTTAGGCGCCGGTGGAGTGGCG
24KR-NcoI	GCCCATGGCCTCGCGGAAAGAATTGTCTG
24KF-XbaI-pROK	ACTCTAGAATGGCTGAATATATAGAAG
24KR-XbaI-pROK	ATTCTAGACTCGCGGAAAGAATTGTCTG
24K-A-pCR8dir	CTTTCCGCGAGAAAGGGCGAATTCG
24K-A-pCR8rev	CGAATTCGCCCTTTCTCGCGGAAAG
35S:YFPN-DCL1	GCGGTACCCCCGGGATGGTAATGGAGGATGAGCCTAG
35S:YFPC-DCL1	GCGGTACCTCAAGAAAAAGTTTTATTTAAAAGCTCAAG
35S:YFPN-HYL1	CCGGATCCATGACCTCCACTGATGTTTCC
35S:YFPC-HYL1	CGGAGCTCCTATGCGTGGCTTGCTTCTGTCTCC
35S:YFPN-SE	GCGGTACCATGGCCGATGTTAATCTTCCTCCG
35S:YFPC-SE	CGGAGCTCTCACAAGCTCCTGTAATCAATAACGG

Tabla 2: Cebadores utilizados para realizar los diferentes clonados.

Nombre	Secuencia 5' --> 3'
pre156Adir	TGACAGAAGAGAGTGAGCAC
pre156Arev	GCTGACAGAAAGAGCAGTGA
pre167Ddir	CACACAAGCAGTCTACAAGG
pre167Drev	CCGCAAGTAGGAAGGAGTGA
pre169Ddir	AATATAATATCATTGTTTGTAGCC

pre169Drev	CTGTGACTTAGCCAAGGAGACTGCC
pre171Adir	AACGGAGATGTTGGAACGGC
pre171Arev	GAGATATTGGCACGGCTCAA
pre172Adir	CTGTAGCAGCGTCCTCAAGA
pre172Arev	CCGTTGCAGCATCATCAAGA
pre393Bdir	CTTGATTAGTGCAGGTGGAGAG
pre393Brev	ATTTAGAGCCATAGATGGGG
pre403dir	GGGGCACATCTCAAGTTTGTG
pre403rev	GGACAGATCGCGAGTTTGTGC
Bpre403dir	TTTGTGCGTGAATCTAACCCC
Bpre403rev	AGATCGCGAGTTTGTGCGTG
Ubqt1	CACCTCGTGCTTCGTCTCCG
Ubqt2	GCGTCCTTCCATCCTCCAGC
A	TAGATCCATGCTCAGTCACC
B	GGTCACAGGTAGTAACAGTT

Tabla 3: Cebadores utilizados para el análisis por PCR en tiempo real de los precursores de miARNs estudiados (Capítulo 2). Por su parte, los cebadores A y B fueron utilizados para chequear la presencia de CPsV en tejido infectado de naranjo (Capítulos 2 y 3).

Nombre	Secuencia 5' --> 3'
CBFA1-L	GGTGCCGTCTCGTGCCAATA
CBFA1-R	TCCTCCCTCATTCACCCACA
CBFA3-L	CATTCATCGTTTCCTGTCCTC
CBFA3-R	GAGCCAAGGATGACTTCCCAAG
CBFA10-L	CACCAAACCCATCCTTACCT
CBFA10-R	GACGATCACCTTCACGCAGA
AP2A-L	CCCTAACTGGGCATGGCAAATG
AP2A-R	AGCCGAAAATGGGAATCCTG
AP2B-L	ACAATGGCAATCTGGTCCTC
AP2B-R	GGTCTAACAAGGGAGTGGA
TIR1-L	TGGGGACAAGGCTCTTTTGG

TIR1-R	CCTGGGCATCTTCTGACCTA
GRR1L	AAGCTGGAAATCAGGGACAG
GRR1R	CAAGGGTAACTTCGCAGGAC
ncRNA-L	CACGAGCTTAGCTGGGTATC
ncRNA-R	GAATCTAACACTGACGGCAA
AGO2B-L	CGGCGGCGGAGACTTTTCG
AGO2B-R	TGACGGCTGGAGACATCG
AGO7-L	TTCTATGGGATGATAACAAG
AGO7-R	GGAGGCACCAATGAAACAGG
Cs-ActinL	CCAAGCAGCATGAAGATTAAGG
Cs-ActinR2	ATCTGCTGGAAGGTGCTGAG
Ubqt1	CACCTCGTGCTTCGTCTCCG
Ubqt2	GCGTCCTTCCATCCTCCAGC

Tabla 4: Cebadores utilizados para el análisis por PCR en tiempo real de los transcriptos *targets* de miARNs analizados (Capítulo 3).

Nombre	Secuencia 5' --> 3'
At-DCL1Dir	AACTGGTGCCATGGTTAGCTTG
At-DCL1Rev	TTGCAATACGAAACACCACGTC
At-HYL1Dir	ATGACCTCCACTGATGTTTCCTCTGG
At-HYL1Rev	TGCGTGGCTTGCTTCTGTCTC
At-SEDir	ATGGCCGATGTTAATCTTCC
At-SERev	TGAACCCAGGGACTTGTAGACG

Tabla 5: Cebadores utilizados para chequear transformaciones de cepas de *E. coli* o *A. tumefaciens* con plásmidos que contienen las proteínas de maquinaria de procesamiento de miARNs provenientes de Fang y Spector, (2007).

V. I. I. Sueros

- Suero anti ratón IgG-HRP: *goat anti-Mouse-IgG* (H+L) – HRP *conjugate* (Bio-Rad).
- Suero anti ratón IgG-HRP: *goat anti-Mouse-IgG* – HRP *conjugate* (*goat anti-mouse IgG-HRP* (Santa Cruz, Biotechnology).

- Suero anti rata IgG-HRP: *goat anti-Rat IgG (H+L) – HRP conjugate* (Chromotek, Alemania).
- Suero policlonal anti conejo IgG, HRP: *goat polyclonal anti-Rabbit conjugate* (Agrisera, Vännäs, Suecia).
- Anticuerpo policlonal anti-HYL1 (Agrisera, Vännäs, Suecia).
- Anticuerpo monoclonal anti GFP JL-8 (Living colours, Clontech, USA).
- Anticuerpo monoclonal anti GFP 3H9 (Chromotek, Alemania).
- Anticuerpo monoclonal anti mRFP 6G6 (Chromotek, Alemania).

V. I. J. Especies vegetales utilizadas y condiciones de crecimiento

En los ensayos biológicos se utilizaron las especies: *N. benthamiana* (*wt*) las cuales se mantuvieron 4-5 semanas en cámaras de cultivo a 22-26°C, con un fotoperíodo de 8 horas de oscuridad y 16 horas de luz, desde su germinación hasta su utilización (Capítulos 2 y 4). *C. sinensis* (L. Osb; naranjo dulce) para la inoculación de virus y posterior obtención de muestras sintomáticas y asintomáticas para los diferentes análisis (Capítulos 2, 3 y 4). Estas plantas se mantuvieron en invernáculo bajo condiciones de temperatura entre 18 a 26°C y luz natural.

V.II. Métodos

V. II. A. Inoculación de cítricos mediante injerto

La inoculación de los cítricos se realiza por injerto en forma de T-invertida con un trozo de corteza proveniente de un plantín infectado con el aislamiento 90-1-1 o CPV-4 de CPsV o con planta sana.

V. II. B. Minipreparación de ADN plasmídico mediante lisis alcalina

La purificación de ADN plasmídico se realizó mediante el método de lisis alcalina desarrollado por Birnboim y Doly (1979) con algunas modificaciones. Una alícuota de 1 ml de cultivo bacteriano saturado en medio LB (Luria-Bertani; Sambrook *et al.*, 1989) con el antibiótico adecuado se centrifuga a 14000g durante 1 minuto. Este procedimiento se repite tres veces. El pellet obtenido se resuspende en 200µl de Solución I (25 mM Tris-HCl pH 8; 50 mM glucosa; 10 mM EDTA) con el agregado de ARNasa A a una concentración final de 20µg/ml, se agregan 300µl de Solución II (0,2 N NaOH; 1 % v/v SDS) y se incuba en hielo durante 5 min. Luego se agregan 300µl de Solución III (3M acetato de potasio pH 4,8) permitiendo la neutralización de la solución. Se mezcla por inversión, se incuba en hielo durante 5 min y se realiza una centrifugación a 14000g por 10 min. Al sobrenadante obtenido se le realizan dos extracciones con un volumen de cloroformo para eliminar proteínas y se precipita el ADN plasmídico presente en la fase acuosa por el agregado de un volumen de isopropanol frío. Se centrifuga por 20 min a 14000g; el pellet se lava con etanol 70 %, se deja secar y se resuspende en agua bidestilada estéril.

V. II. C. Extracción de ARN de tejido vegetal

La extracción de ARN total de material foliar se realizó utilizando el reactivo Tri-Reagent (Molecular Research Center, MRC, EEUU) según especificaciones del fabricante. Partiendo de 50 a 200 mg de tejido, previamente molido en N₂ líquido. El ARN total obtenido se resuspende en 10 a 50µl de agua bidestilada estéril libre de ARNasas.

V. II. D. Digestión con ADNasa libre de ARNasa

Para eliminar el posible ADN genómico contaminante en las muestras de ARN total se realizó un tratamiento con ADNasa libre de ARNasa. Se estimó la concentración de ARN total de la muestra a partir de la cuantificación de la absorbancia a 260nm medida en un NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies). Se digirió 2µg de ARN con 1U de la enzima RQ1 ADNasa libre de ARNasa (Promega). Se utilizó el *buffer*

suministrado por el fabricante en un volumen final de 10 μ l. Se incubó durante 30 min a 37°C, luego se agregó 1 μ l de la solución Stop (EGTA 20mM, Promega) y se incubó durante 10 min a 65°C para inactivar la enzima. Estas muestras fueron luego utilizadas para llevar a cabo la reacción de transcripción reversa.

V. II. E. Reacción de transcripción reversa (RT)

Las reacciones de RT se realizaron en 25 μ l finales. Partiendo de 4 μ l de la muestra tratada con ADNasa, se agrega el cebador reverso a una concentración final de 2,6 μ M y 6,96 μ l de agua bidestilada libre de ARNasas. Se incubaba a 80°C durante 10 min y se enfriaba rápidamente en agua-hielo por 5 min. Se agregan 100U de transcriptasa reversa M-MLV (Promega, Madison, USA), 20 U de ARNasin® Inhibidor de Ribonucleasa (Promega, Madison, USA), 5 μ l de dNTPs (10mM de cada uno) y 5 μ l del *buffer* 5X de la enzima. Se incubaba a 42°C por 60 min y luego a 70°C durante 15 min. El producto generado en la reacción de RT se utiliza posteriormente como molde en reacciones de PCR o qPCR.

V. II. F. Reacción de PCR a tiempo final

Las reacciones de PCR se realizaron en un ciclador Gene Amp PCR System 2400 (PERKIN ELMER). Las reacciones se llevaron a cabo de acuerdo a las recomendaciones de cada fabricante, según la enzima utilizada (Taq DNA Polimerasa, Genbiotech SRL; Go Taq DNA Polimerasa, Promega; PfuUltra II Fusion HS DNA Polimerasa, Agilent Technologies). Las condiciones de ciclado generalmente fueron de 7 min a 95°C como etapa inicial de desnaturalización, 35-45 ciclos de 20seg a 95°C, 30seg a la temperatura de *melting* (T_m) del par de cebadores usado en cada caso, una etapa de extensión a 72°C (o 68°C para la PfuUltra II Fusion HS) durante el tiempo requerido por la polimerasa para amplificar cada fragmento (por cada 1Kpb a amplificar se utilizó 1min de extensión con la Taq y Go Taq y 30seg para la PfuUltra II Fusion HS) y una etapa de elongación final de 7min a 72°C o 68°C según corresponda. Los productos de PCR se analizaron

mediante electroforesis en gel de agarosa 1-3% en *buffer* TAE 1X en presencia de bromuro de etidio.

V. II. G. PCR cuantitativa (qPCR)

Las reacciones para la cuantificación de los pre-miARNs y *targets* de miARNs (Capítulos 2 y 3, respectivamente) se llevaron a cabo en un ciclador térmico de PCR en tiempo real (qTOWER 2.0, Analytik Jena AG), con volumen final de 10µl. La reacción contenía 1µl del ADNc (para el caso de los *targets*, se usaron diluciones 1/6 del ADNc); 0.5µl de cada cebador (directo y reverso) 10µM y 4µl de HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix (Rox) (Solis BioDyne). Cada reacción incluyó una primera etapa a 95°C durante 10 min, seguida de 60 ciclos de 20seg a 95°C, 30seg a la T_m de los cebadores a utilizar (variaron entre 48°C y 55°C) y 20seg a 72°C. Seguidamente se realizaron las curvas de *melting* para cada producto de reacción (60–95°C 6seg con ΔT 1°C). La normalización de los datos fue realizada mediante la amplificación de los genes Ubiquitina y Actina. Todos los experimentos de qPCR se realizaron utilizando al menos tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas. La amplificación de un único producto fue verificada posteriormente mediante genes de agarosa en presencia de bromuro de etidio.

V. II. H. Reacciones enzimáticas utilizadas en Ingeniería genética

V. II. H. 1. Desfosforilación de fragmentos de restricción

Para realizar la desfosforilación de los extremos del ADN digerido se utilizó la enzima Fosfatasa alcalina, CIP (*calf intestinal*) de NEB (Beverly, USA) o FastAP, fosfatasa alcalina supersensible de Thermo Scientific (USA). Para fragmentos de restricción 5' protruyentes se utiliza 0,1 U de enzima por pmol de molde y para fragmentos 3' protruyentes o romos se utiliza 1 U de enzima por cada pmol de molde en presencia de *buffer* de la enzima (100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, pH 7.9). Se incubó 1 hora a 37°C. Posteriormente se inactiva la enzima agregando EDTA pH 8 a una concentración final de 5mM, incubando 10 min a 75°C

y realizando una extracción fenol-cloroformo seguida de precipitación alcohólica del ADN.

V. II. H. 2. Reacciones de ligación

En general, cuando se ligaron insertos con extremos protruyentes o productos generados por PCR se usó una relación molar de inserto:vector de 3:1 o 10:1 dependiendo del tamaño de los fragmentos a ligar. En cambio, cuando se ligaron moléculas con extremos romos, la relación molar inserto:vector utilizada fue de 5:1. En la mezcla de reacción se utiliza 1 U de T4 DNA ligasa por cada 1µg de molde y el *buffer* de la enzima (30mM Tris-HCl pH 7.8, 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 1mM ATP). Para extremos cohesivos se realiza una incubación por 3 horas a temperatura ambiente. Cuando se realiza la ligación de extremos romos se incuba *overnight* para incrementar la eficiencia del proceso. En el caso de ligaciones de productos de PCR siempre utilizó el sistema pGEM®-T Easy Vector (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

V. II. H. 3. Digestión con enzimas de restricción

V. II. H. 3. 1. Digestión total

Las reacciones de digestión de ADN se realizaron de acuerdo a las condiciones especificadas por los proveedores. En general, para digerir totalmente 1µg de ADN se utiliza 1 U de enzima en el *buffer* correspondiente y se incuba en las condiciones adecuadas. La inactivación de la enzima se realiza de acuerdo a las especificaciones comerciales (por calor o eliminación mediante extracción con fenol-cloroformo). Para corroborar que la digestión fue completa se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa incluyendo los controles de digestión correspondientes y marcadores de peso molecular.

V. II. H. 3. 2. Digestión parcial

Cuando fue necesario realizar digestiones parciales del ADN a fin de recuperar un fragmento determinado del patrón de digestión obtenido, primero se realizó una digestión de prueba. Para ello, se mantiene la concentración de enzima (1U por 1µg de molde, en *buffer* y temperatura adecuada) y se realiza la incubación a diferentes tiempos a fin de determinar la condición óptima para obtener el fragmento deseado.

Una vez establecida dicha condición se realiza la digestión y se recupera del gel de agarosa el fragmento de tamaño adecuado mediante *gene clean*.

V. II. I. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa (*gene clean*)

El procedimiento utilizado es el que se detalla en el protocolo de AccuPrep® PCR Purification Kit (Bioneer). El fragmento de gel que contiene el ADN a recuperar se disolvió con 3 volúmenes de NaI 6M, calentando a 60°C por 15min o hasta que el fragmento se disuelve por completo. Esta solución se deja enfriar por unos min, se mezcla y se hace pasar por una columna de sílica (para fragmentos <200pb o >3kb se agregó 1 volumen de isopropanol antes de pasar por la columna). La columna se lava tres veces con solución de lavado (solución de NaCl, Tris, EDTA, agua y etanol provista por el fabricante) y se deja secar a temperatura ambiente para eliminar restos de alcohol. Finalmente se agrega 40µl de agua bidestilada estéril sobre la matriz de sílica de la columna, se incuba por unos min temperatura ambiente, y se centrifuga durante 1 minuto a 14000g. La solución resultante contiene el ADN de interés.

V. II. J. Preparación y transformación de bacterias competentes

V. II. J. 1. Preparación de bacterias competentes para electrotransformación

El protocolo para la obtención de bacterias de *E. coli* competentes para electrotransformación se basó en el reportado por Dower *et al.* (1988). A partir de un cultivo saturado se realizó una dilución 1:100 en 1L de medio LB sin NaCl y se cultivó a 37°C con agitación hasta alcanzar una DO^{600nm} de 0,5. Las bacterias se centrifugaron a 4°C durante 10 min y a 5000g. El sedimento bacteriano se resuspendió en glicerol 10% v/v. Este procedimiento se repitió tres veces disminuyendo el volumen de glicerol utilizado en los lavados. Por último, las bacterias se resuspendieron en 2 ml de glicerol 10% v/v, se fraccionaron en alícuotas y se congelaron rápidamente a -80°C hasta su uso.

Para la obtención de bacterias electro-competentes de *A. tumefaciens* para electrotransformación, se partió de 1L de cultivo inoculado inicialmente a partir de una única colonia de bacterias, se creció a 28°C durante el tiempo necesario para alcanzar una $DO^{600nm} = 0,5-0,6$ (aproximadamente 16 a 18 horas). Las bacterias se incuban durante 15 min en hielo y se centrifugan a 6000g durante 15 min a 4°C. El *pellet* se resuspende en 500ml de agua bidestilada estéril a 4°C y se centrifuga nuevamente a 6000g durante 15 min a 4°C. El *pellet* obtenido se resuspende en 5ml de agua bidestilada estéril a 4°C y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones. Finalmente, las células se resuspenden en 2ml de glicerol 10% v/v, se fraccionan en alícuotas y se congelan rápidamente a -80°C hasta su uso.

V. II. J. 2. Preparación de bacterias competentes químicas

Para la obtención de bacterias competentes química de *E. coli* se utilizó el método de cloruro de rubidio. Para ello se colocaron 5ml de un cultivo *over night* (ON) en 500 ml de medio Psi (1L: 5 gr de extracto de levadura, 20 gr triptona, 5 gr $MgSO_4$) y se inocularon a 37°C con agitación hasta alcanzar una DO^{600nm} : 0,5. Se colocó luego 15 min en hielo y posteriormente se centrifugó a 5000g por 10 min. Se descartó el sobrenadante y se re-suspendió el *pellet* en 0.4 volúmenes de *buffer* TbfI (Acetato de potasio 30mM; cloruro de rubidio 100mM; cloruro de calcio 10mM; cloruro de magnesio 50mM; glicerol 15%, se ajustó el pH con ácido acético diluido a un valor de pH:5.8). Se colocó en hielo por 15 min y luego se centrifugo a 4000g por 10 min. Luego se descartó el sobrenadante y se re-suspendió el *pellet* en 0.04 volúmenes de *buffer* TfbII (MOPS 10mM; cloruro de calcio 75mM; cloruro de rubidio 10mM; glicerol 15%; se ajustó el pH: 6.5 utilizando NaOH). Se colocó en hielo luego 15 min más. Finalmente, se fraccionó en alícuotas y se congelaron rápidamente a -80°C hasta su uso.

Para la obtención de bacterias competentes químicas de *A. thumefaciens* se partió de 25ml de un pre-cultivo crecido a 28°C *overnight* en un matraz de 200ml con los antibióticos correspondientes. Cinco mililitros saturados de pre-cultivo se utilizaron para inocular 100ml de medio con antibióticos, contenido en un matraz de 500ml. Se crece en agitación a 28°C hasta alcanzar una DO^{600nm} de entre 0,5-0,6. Una vez alcanzado se centrifuga el cultivo en tubos Beckman de 250ml a 6000rpm y 4°C

durante 10min. Se elimina el sobrenadante y se resuspende en 20ml de NaCl 150mM. Se vuelve a centrifugar en tubos Beckman a 6000rpm y 4°C durante 10min. Se elimina el sobrenadante y se resuspende en 2,5ml de CaCl₂ 20mM. Se distribuye en alícuotas de 100µl en tubos *eppendorf* estériles y se congelan rápidamente en Nitrógeno líquido. Se almacenan a -80°C hasta su utilización.

V. II. J. 3. Transformación de bacterias competentes

Para introducir los plásmidos de interés en las bacterias electro-competentes se utilizó un electroporador Bio-Rad Gene Pulser™. Se mezclaron las bacterias electro-competentes con el plásmido o producto de ligación deseado, se incubó en hielo durante 5 min y se colocó la mezcla en una cubeta de electroporación. Una vez ajustadas las condiciones de electroporación (2,2kV/0,2cm; 25µF y 200Ω para *E. coli*; 2,2kV/0,2cm; 25µF y 400Ω para *A. tumefaciens*) se sometió a las bacterias al pulso eléctrico. Inmediatamente se las diluyó con 1ml de medio SOC sin antibiótico, se las incubó durante 1 hora a 37°C para *E. coli* o 2-3 horas a 28°C para *A. tumefaciens* y se las sembró en placas de LB conteniendo los antibióticos correspondientes para la selección de transformantes.

Para el caso de bacterias *E. coli* competentes obtenidas por método químico, se mezclan las bacterias con 7µl del producto de ligación y se incuban durante 30 min en agua-hielo. Luego se aplica un *shock* térmico por 2 min a 42°C y la mezcla se incuba nuevamente en agua-hielo durante 10 min. Posteriormente se agrega 1ml de medio LB sin antibiótico y se incuban a 37°C con agitación durante una hora. Se siembran en placas de LB con el antibiótico adecuado incubando a 37°C *overnight*.

Para el caso de bacterias *A. thumefaciens* competentes obtenidas por método químico, se mezclan las bacterias con 1-5µg del plásmido de interés y se incuban durante 5 min a 37°C. Posteriormente se congelan rápidamente en Nitrógeno líquido. Se descongelan y se agregan 500µl de medio LB sin antibiótico y se incuban a 28°C con agitación durante 2-3 horas. Se centrifugan 3min a Vmax, se eliminan 500µl de sobrenadante y se siembran en placas de LB con el antibiótico adecuado incubando a 28°C. Se observan colonias crecidas a los 2-3 días.

V. II. K. Colony-PCR

La presencia de los vectores introducidos se verificó por PCR analizando el tamaño de los insertos en las bacterias transformadas, con los cebadores correspondientes en cada caso. Para ello, se utilizó una pequeña cantidad de cultivo bacteriano crecido en medio sólido que se resuspendió en 10µl de agua bidestilada estéril y se incubó a 100°C durante 3 min. Se centrifugó a 14000g durante 3 min y se utilizó una alícuota del sobrenadante como molde en las reacciones de PCR. Los productos se chequearon en geles de agarosa al 0,8-1% y bromuro de etidio.

V. II. L. Agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana*

Los experimentos de agroinfiltración se realizaron en plantas de *N. benthamiana* de 4 a 5 semanas de edad. Cultivos saturados de *A. tumefaciens* se precipitan por centrifugación durante 8min a 5500rpm, se diluyen las bacterias en agua hasta un valor de DO^{600nm} de 0,1-0,5, dependiendo del cultivo, y se infiltran en el lado abaxial de la hoja utilizando una jeringa de 1ml sin aguja.

V. II. M. Extracción de proteínas totales de tejido vegetal

Inmediatamente después de coleccionar las hojas, se muele el tejido foliar en N₂ líquido y se homogenizan 100-200mg del tejido molido en 200µl de *buffer* de extracción (75mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glicerol, 5% β-mercaptoetanol, 2% SDS, 1mM PMSF). Luego se incuba en *vortex* a 4°C durante 20 min. Se centrifuga a 14000g por 10 min y al sobrenadante se le agrega un volumen de SB 4X (62,5mM Tris-HCl pH6.8; 2% p/v SDS; 10% v/v glicerol; 5% v/v β-mercaptoetanol; 0,001% p/v azul de bromofenol). Las muestras se hierven por 10 min y se centrifugan durante 5 min a 14000g para eliminar agregados.

V. II. N. Ensayos de RIP

Este protocolo se puso a punto durante esta tesis y fue utilizado para el estudio de pre-miARNs unidos a proteínas mostrado en el Capítulo 2 (Marmisolle *et al.*, 2018;

trabajo adjunto al final de la tesis). Los pasos a seguir se detallan a continuación y se esquematizan en la Figura 53:

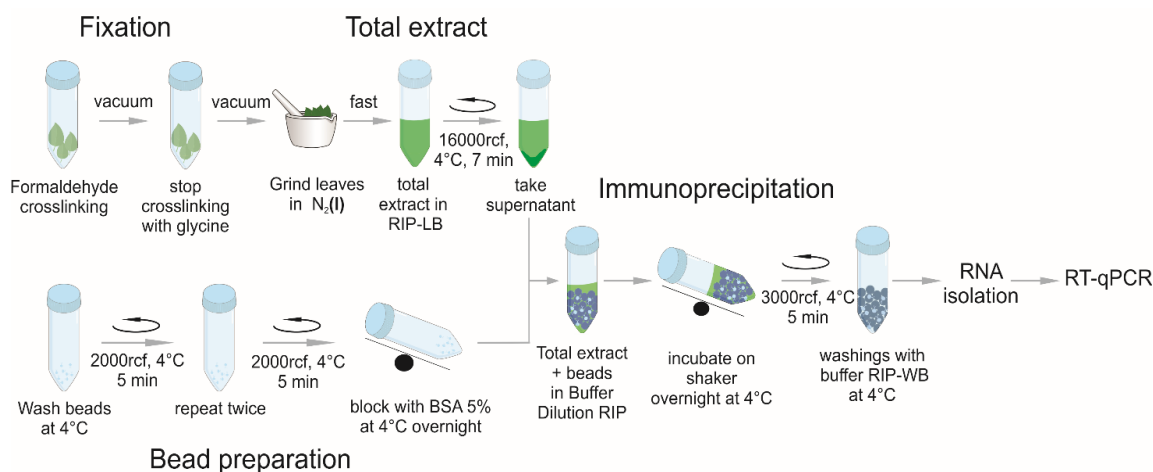


Figura 53: Representación esquemática de los pasos seguidos durante el protocolo de inmunoprecipitación de ARN unido a proteínas. Tomado de Marmisolle *et al.*, 2018.

V. II. N. 1. Crecimiento de plantas e infiltración

Se crecieron plantas de *N. benthamiana* en macetas en cámaras de día largo (16 hs de luz y 8 hs de oscuridad) a 24°C. Las mismas fueron utilizadas para infiltrar con los cultivos de *A. thumefaciens* a ensayar cuando alcanzaron las 4 hojas. Luego de 4 días post-agroinfiltración, se colecta el tejido y muele en nitrógeno líquido.

V. II. N. 2. Preparación de las *beads* del sistema GFP-Trap - Día 1

[Nota: mantener los tubos en hielo durante el proceso]

Lavado: Lavar 30µl de GFP-Trap con 1ml de *buffer* RIP-LB frío (EDTA 5mM pH=7,5, Tris-HCl 20mM pH=7,5, NaCl 150mM, MgCl₂ 1mM, CaCl₂ 1mM, SDS 0,1%, Deoxicolato de sodio 1%, Tritón X-100 1%. Antes de usar agregar: PMSF 5mM, DTT 5mM), durante 5 min a 4°C. Centrifugar 5 min a 2000rcf y 4°C. Retirar el sobrenadante y repetir el lavado 2 veces más. Nota: tener en cuenta que las *beads* precipiten (fondo blanco) al centrifugar, sino repetir la centrifugación.

Bloqueo: Se agregan 500µl de RIP-LB + 5% BSA (albumina de suero bovino) sobre las *beads* [Por ejemplo: agregar 0,150gr en 3ml de RIP-LB] y se incuba toda la

noche en agitación suave a 4°C. Al momento de usarlas, centrifugar durante 3min a 2000rcf y retirar el sobrenadante.

V. II. N. 3. Fijación- Día 2

Se colocan 5 hojas de *N. benthamiana* en un tubo falcon de 50ml y se agregan 10ml de formaldehído 1% (el nivel debe cubrir las hojas). Se aplica vacío con bomba, 60-64cmHg durante 15 min (en 5 segmentos de 3 min). [Nota: chequear que todas las hojas hayan absorbido el líquido]. Descartar el formaldehído y reemplazarlo por glicina 125mM. Aplicar vacío con bomba, 60-64cmHg durante 15 min (en 5 segmentos de 3 min). Sacar la glicina del medio y lavar las hojas 4 veces con agua destilada estéril a 4°C. Remover el líquido. Pasar las hojas cuidadosamente por papel absorbente para retirar el resto de líquido.

V. II. N. 4. Preparación del extracto total

Se agregan 500µl de RIP-LB frío en un *ependorf* de 1,5ml y se coloca en hielo. Se añaden 50U/tubo de RNAsin y sobre esto se agrega 0,5gr de molienda de las hojas agroinfiltradas. Vortexear 15 min a 4°C e incubar 10 min en hielo. Centrifugar 7 min a 16000rcf y 4°C y pasar el sobrenadante a un tubo nuevo pre-enfriado. Volver a centrifugarlo. [Nota: este paso se repite con el fin de eliminar desechos]

V. II. N. 5. Inmunoprecipitación

Agregar sobre las *beads* lavadas (paso V.II.Ñ.2) en orden: 550µl de *Buffer dilution RIP* (Tris-HCl 10mM pH=7,5, NaCl 150mM y EDTA 0,5mM) y 50µl del sobrenadante del extracto del paso anterior. Agregar 40U/tubo de RNAsin.

CONTROL “INPUT”: En un *ependorf* 1,5ml nuevo agregar: 550 µl de *Buffer dilution RIP* y 50 µl del sobrenadante del extracto. Agregar 40U/tubo de RNAsin.

[Almacenar el resto del sobrenadante de extracto rápidamente a -80°C]

Incubar ambos grupos de tubos (la muestra con las *beads* y el control INPUT) toda la noche a 4°C con agitación suave.

Día-3: Centrifugar los tubos con las *beads* 5 min a 3000rcf y 4°C. Tomar el sobrenadante. Congelar rápidamente en N₂(liq) y guardar en -80°C (CONTROL UNBOUND). Agregar a las *beads* 1ml de RIP-WB (Tris-HCl 50mM pH=7,5, NaCl

500mM, MgCl₂ 4mM, Deoxicolato de sodio 0,5%, SDS 0,1%, Urea 2M. Antes de usar agregar: DTT 2mM) a 4°C. Centrifugar 5 min a 3000rcf y 4°C. Descartar cuidadosamente el sobrenadante y repetir el lavado 4 veces más. Finalmente, lavar con 1ml de RIP-LB frío. Centrifugar 5 min a 3000rcf y 4°C. Descartar el sobrenadante.

[Nota: las *beads* se observan como un precipitado blancuzco poco definido. Puede ser necesario repetir la centrifugación]

V. II. N. 6. Purificación de ARN

Agregar 400 µl de reactivo TRI-Reagent® a los tubos con las *beads* y a los de CONTROL DE INPUT. Vortexear 15 segundos. Incubar 5 min a 55°C. Agitar los tubos con la mano cada 30 segundos. Agregar 100 µl de cloroformo y mezclar vigorosamente con la mano a temperatura ambiente por 3 min. Centrifugar 15 min a 12000rcf y 4°C. Tomar cuidadosamente la fase acuosa y pasar a otro tubo.

[Nota: evitar tomar fase orgánica para que no interfiera en pasos posteriores]

Agregar 1 volumen de isopropanol. Mezclar. Incubar 40 min a temperatura ambiente. Centrifugar 15 min a 12000rcf y 4°C y luego, descartar el sobrenadante cuidadosamente. Lavar el *pellet* de ARN con 500 µl de etanol pre-enfriado a -20°C. Centrifugar 5 min a 12000rcf y 4°C. Descartar sobrenadante. Secar al aire 15-30 min.

Resuspender los *pellets* de INPUT en 20 µl de agua libre de ARNasa libre de ARNasa. los *pellets* del inmunoprecipitado en 8 µl de agua libre de ARNasa. [Nota: el ARN puede estar en muy baja concentración. Es conveniente no medirlo].

V. II. O. Co-inmunoprecipitación de proteínas: GFP-Trap

Para realizar las co-inmunoprecipitaciones de proteínas del Capítulo 4, se empleó el sistema GFP-Trap (Chromotek, Alemania). Luego de chequear la expresión de proteínas mediante microscopia de fluorescencia, se fija el tejido sumergiéndolo en una solución de formaldehído 1%. Se aplica 70cm-Hg de vacío con un *Speed Vac*

Concentrator durante 10 min liberando el mismo cada 2-3min (debe chequearse que todo el tejido se haya infiltrado con la solución). Luego, se agrega glicina a una concentración final de 125mM, y se repite el proceso durante 5 min más. Las hojas se lavan con H₂O bidestilada estéril abundantemente. Se secan por contacto con papel y luego se muelen con N₂ líquido y mortero.

V. II. O. 1. Purificación de núcleos desde tejido de *Nicotiana benthamiana*

Con la intención de aumentar el nivel de detección de las proteínas nucleares en los ensayos de CoIP y evitar contaminaciones citosólicas, (principalmente para el caso de los controles con mRFP libre) realizamos un enriquecimiento de núcleos por centrifugaciones sucesivas en soluciones de sacarosa de concentraciones variables, como se detalla a continuación.

Se parte de 5g de molienda y se le añaden 40ml de *buffer* de extracción I (20mM Tris-HCl pH8 0,4M sacarosa 10mM MgCl₂, 5mM β-mercaptoetanol, 0,2mM PMSF). Luego se deja en hielo durante 10 min, mezclando por inversión cada 2 min. Los extractos proteicos se filtran con papel de filtro *Whatman* para eliminar restos de material vegetal. Se centrifugan las muestras a 2000g y 4°C durante 20 min. Se resuspende el *pellet* en 20ml de *buffer* de extracción II (10mM Tris-HCL pH 8, 0,25M sacarosa, 10mM MgCl₂, 5mM β-mercaptoetanol, 1% Tritón x-100, 0,2mM PMSF). Se centrifuga a 2000g y 4°C por 10 min. Se resuspende el *pellet* en 500μl de *buffer* de extracción III (10mM Tris-HCL pH 8, 1,7M sacarosa, 2mM MgCl₂, 5mM β-mercaptoetanol, 0,15% Tritón x-100, 0,2mM PMSF) y se agrega delicadamente dicha suspensión sobre 500μl de *buffer* de extracción III en un tubo *ependorf* de 1,5ml. Se centrifuga durante 10 min a 13000rpm y 4°C para precipitar los núcleos.

Una vez enriquecidos los núcleos, se extraen las proteínas mediante el agregado de 300μl de *buffer* RIPA (10mM Tris/Cl pH 7.5; 150mM NaCl; 0,5mM EDTA; 0,1% SDS; 1% Tritón X-100; 1% Deoxicolato de Na; suplementado con 2.5mM MgCl₂ y 1mM PMSF). Se sonicán las muestras con *rounds* de 30seg x 30seg entre sonicación (TESTLAB Ultrasonic Cleaner; 260W de potencia y 40Khz de frecuencia) e incubación en hielo, hasta completar 30 min. Se centrifuga 10 min a 10000rpm y 4 °C. El sobrenadante se incuba *overnight* con 25μl de GFP-Trap a 4°C y agitación

continua. Luego se centrifugan a 2500g por 2 min a 4°C, se descarta el sobrenadante, y las *beads* de agarosa se lavan tres a cuatro veces con *buffer* de dilución (10mM Tris-HCl pH7.5, 0.5mM EDTA, 150mM NaCl). Se agregan 30µl de *buffer* RIPA y 15µl de *buffer* SB3X (0,15M Tris-HCl pH 6.8, 6% SDS, 30% glicerol, 30% β-mercaptoetanol, 0.075% azul de bromofenol, llevar a volumen con Urea 8M). Finalmente se agregan 0,36µl de DTT 0,5M en cada muestra. Se incuban a 105°C durante 15 min. Por último, se centrifugan a 2000g por 2 min antes de ser utilizadas y sembradas en el gel.

V. II. P. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE)

El análisis electroforético de las muestras proteicas se efectuó utilizando el equipo Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la preparación del gel de poliacrilamida se siguió el protocolo descrito por Laemmli (1970) con modificaciones como se describe en Mini-PROTEAN® Tetra Cell Manual, Bio-Rad (California, USA). Las muestras se sometieron a electroforesis a 80V hasta su entrada en el gel de apilamiento y luego a 120V en el gel de separación. El *buffer* de corrida utilizado consistía en Tris 25mM, Glicina 192mM y SDS 0,1%. El porcentaje de acrilamida utilizado para los geles de separación varió entre 8% y 12%, de acuerdo al tamaño de las proteínas analizadas.

V. II. Q. Análisis de proteínas por *Western blot*

Para la transferencia de las proteínas separadas mediante SDS-PAGE a membrana de Polifluoruro de vinilideno (Amersham Hybond P 0.45 PVDF *blotting membrane*) se utilizó el sistema Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratorios, California, USA) y se procedió de acuerdo a las especificaciones del fabricante descritas en el manual de instrucciones. La transferencia se lleva a cabo a 80V durante 90 min en *buffer* de transferencia frío (Tris 25mM; Glicina 192mM), una vez finalizada, se bloquea la membrana con 5% p/v de leche descremada en TBS (20mM Tris-HCl pH 7.5; 500mM NaCl) durante 1 hora en

agitación a temperatura ambiente. Se realiza un lavado en TBS durante 5 min en agitación suave. Se incuba la membrana en agitación *overnight* y 4°C con la dilución adecuada del anticuerpo primario en 1X de TBS-T (TBS con el agregado de 0,05% v/v de Tween-20) y 5% p/v de leche descremada. Al día siguiente, se realizan 3 lavados con TBS-T durante 10 min en agitación y temperatura ambiente. Se incuba durante 90-120 min a temperatura ambiente con la dilución adecuada del anticuerpo secundario diluido en TBS-T con 5% p/v de leche descremada. Se realizan 3 lavados con TBS-T durante 10 min en agitación y un último lavado de 5 min en TBS para eliminar las trazas de detergente.

Para el revelado de la membrana se preparan las soluciones A (500µl Tris-HCl 1M pH 8.5; 30µl de H₂O₂ 30%; 4,470 ml de H₂O bidestilada) y B (500µl Tris-HCl 1M pH 8.5; 50µl de ácido cumárico 90mM; 22µl de luminol 250mM; 4,428 ml de H₂O bidestilada). Se mezclan los 5ml de ambas soluciones al momento de ser utilizadas y se incuba la membrana por 30seg agitando manualmente para cubrir toda la superficie de la misma. Se retiran los restos del sustrato secando la membrana con papel de filtro y se expone a una placa radiográfica durante el tiempo necesario en oscuridad. Las placas son sumergidas luego en solución de revelado (revelador y reforzador Carestream X-OMAT MX) unos min y luego de pasarlas por H₂O destilada, por una solución de fijador (MF-53 Fijador Manual Eco-Ray, Traeco S.A.).

V. II. R. Microscopía de fluorescencia

Se empleó un microscopio de epifluorescencia Nikon eclipse Ti equipado con un filtro para GFP y otro RFP y objetivos 10X y 40X. Para las imágenes de microscopía confocal se empleó un microscopio Leica TCS SP5 II equipado con un objetivo HCX PL APO CS 63.0X 1.40 UV de inmersión en aceite o por medio de un microscopio Confocal Zeiss 780 con objetivo 40x de inmersión en agua, dos detectores PMTs, un detector GaAsP de alta sensibilidad de 32 canales (que permite trabajar en el modo de *photon counting*); el cual utiliza el programa Zen 2011 para la captación de imágenes. Las longitudes de onda de excitación y emisión utilizadas fueron: de 488/524–550nm para eGFP, 433/445-475/503nm para CFP, 514-527nm para YFP,

543/566-634nm para mRFP. Las imágenes fueron procesadas con el *software* ImageJ.

V. II. S. Complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC)

Esta técnica fue implementada para los ensayos de interacción *in vivo* de proteínas mostrados en el Capítulo 4. Para ello, se utilizaron versiones modificadas del plásmido pROK2, conteniendo los segmentos N- o C-terminales de la proteína reportera YFP (pROK-sYFPN y pROK-sYFPC, respectivamente; González *et al.*, 2010). Sobre estos vectores se clonaron las secuencias codificantes correspondientes a la proteína 24K^{CPsV} y las proteínas de maquinaria DCL1^{At}, HYL1^{At} y SE^{At} (^{At}= *Arabidopsis thaliana*). Contamos, además, con las construcciones conteniendo las proteínas AGO1^{At} y AGO4^{At} para estos vectores (González *et al.*, 2010). A su vez, realizamos los mismos ensayos con vectores conteniendo las proteínas de maquinaria fusionadas a los extremos N- y C-terminales de la proteína reportera Citrina (pAS054 o pAS059, respectivamente), cedidos gentilmente por el laboratorio de Biología del ARN- IAL, Santa Fe). Sobre estos vectores se clonó la secuencia codificante de la proteína 24K^{CPsV}.

Mezclas de cultivos de *A. tumefaciens* conteniendo los diferentes vectores a ensayar (DO^{600nm}=0,3) fueron co-agroinfiltrados con el vector pROK2:Fibrillarina-mRFP (DO^{600nm}=0,1) (Kim *et al.*, 2007b) y el vector conteniendo la proteína supresora p19 (DO^{600nm}=0,2) (Voinnet *et al.*, 2003) en plantas de *N. benthamiana*. Discos de las mismas fueron observados al microscopio confocal a los 3-4 dpa para evaluar la reconstitución de la proteína reportera YFP o Citrina.

V. II. T. Análisis bioinformáticos

V. II. T. 1. Predicción bioinformática de transcritos *targets*

Para predecir posibles genes blanco de miARNs codificados en *C. sinensis* (Capítulo 3), se utilizaron dos herramientas *online*: comTAR (<http://rnabioinformatics.org>)

conicet.gov.ar/comtar/ ; Chorostecki y Palatnik, 2014) y psRNATarget (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/> ; Dai y Zhao, 2011).

Se utilizó comTAR para los miARNs miR169, miR172 y miR393. Esta herramienta permite la búsqueda de *targets* para miARNs conservados. Las condiciones de búsqueda fueron: (1) 10 como el mínimo número de especies donde está presente el mismo *target* para ese miARN en particular. Esta es la condición de búsqueda más estricta dentro de comTAR; (2) un *cut-off* de mínima energía libre de hibridación de 72PE; (3) solo un *mismatch* permitido entre las posiciones 1 y 11 de la secuencia consenso de miARN. Los *targets* predichos elegidos tenían 2 *mismatches* como máximo.

Por otra parte, se utilizó la herramienta psRNATarget para buscar posibles transcriptos blanco para el miR403. La secuencia del miR403 usada fue: TTAGATTACGCGACAAACTCG, la cual se obtuvo de la base de datos de miRBase (<http://www.mirbase.org/>; csi-miR403: MIMAT0018471). La biblioteca usada para la predicción fue: *C. sinensis* (sweet orange group), transcript, JGI genomic project, Phytozome 11, 154 v1.1. Las configuraciones de búsqueda fueron: (1) 19 nt para la región en la que el servidor obtendrá una complementariedad entre el miARN y el ARNm *target*; (2) 5 como límite máximo de puntaje basado en un esquema de puntaje dado; (3) solo dos *mismatches* permitidos en la región de complementariedad comprendidas entre las posiciones de los nucleótidos 2–13 del 5' terminal del miARN (región semilla); (4) una penalización de 1.5 extra por *mismatches* en la región semilla; (5) consideración de pares de bases no canónicos como desajustes; (6) medio *mismatch* por pares G:U y 1 como penalización de otros *mismatches*; (7) se permitieron *gaps* pero con una penalización de 0.5. Los *targets* predichos no se tomaron en cuenta si la penalización por *mismatch* superó la línea de corte.

Tanto AGO2 como AGO7 fueron obtenidas por comparación de secuencias nucleotídicas con AGO2 (At1g31280) de *A. thaliana* usando Phytozome Blast (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!search?show=BLAST>), el cual previamente había sido reportado como *target* del miR403 (Allen *et al.*, 2005). En ese caso, se permitió la presencia de más de dos *mismatches* entre el miARN y el *target*.

Se realizó además un análisis de ontología mediante la herramienta InterProScan (EMBL-EBI; <https://www.ebi.ac.uk/interpro/interproscan.html>; Jones *et al.*, 2014). Evaluamos la presencia de diferentes dominios para los *targets* predichos usando las secuencia peptídicas provistas por *Citrus sinensis* annotation Project (<http://citrus.hzau.edu.cn/orange/>).

V. II. T. 2. Análisis de degradoma mediante CleaveLand4

Para poder realizar un análisis completo de “degradoma” se instaló localmente el *pipeline* de CleaveLand4 y se usó el genoma de *C. sinensis* (*Citrus sinensis*, URL: <http://citrus.hzau.edu.cn/orange/download/csi.chromosome.fa.tar.gz>; Xu *et al.*, 2013) y los datos publicados por Liu *et al.* (2014) (los grupos de datos utilizados como *Input* en formato fastq fueron: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE46765> y <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE18207>). Seguidamente se utilizó los miR169, miR172, miR393 y miR403 de la base de datos miRBase (<http://www.mirbase.org/>) para el análisis. CleaveLand4 primero predice sitios de corte sobre el ARNm *targets* para el miARN usado. Luego, realiza una clasificación de los eventos de degradoma basado en la abundancia de lecturas sobre los cortes alineados cerca de los supuestos sitios de corte en el transcripto *target*. El programa considera 5 categorías: Categoría 0: >1 lecturas, igual al máximo en el transcripto, cuando solo hay 1 posición en el valor máximo. Categoría 1: >1 lecturas, igual al máximo en el transcripto, cuando hay >1 posición en el valor máximo. Categoría 2: >1 lectura, por encima de la profundidad promedio, pero no el máximo en la transcripción. Categoría 3: >1 lectura, pero inferior o igual a la profundidad de cobertura promedio (sin ceros) en el transcripto. Categoría 4: Solo una lectura en esa posición.

El *pipeline* de CleaveLand4 se corrió con las condiciones *default*, usando GSTAr.pl (Addo-Quaye *et al.*, 2009) para la predicción del sitio de corte y Bowtie (Langmead, 2011) para alinear las lecturas. Se seleccionaron apareamientos con $p < 0.05$ y categorías de degradoma de 0 a 2.

V. II. T. 3. Análisis bioinformático de las secuencias proteicas de *Ophiovirus*

Para realizar los alineamientos múltiples de las secuencias de *Ophiovirus* se usó Psi-Coffee (Di Tommaso *et al.*, 2011; Taly *et al.*, 2011) y PROMALS (Pei *et al.*, 2007). El modelado de la proteína de 24K^{CPsV} se realizó con el *software* I-TASSER (Yang *et al.*, 2015). La validación de los mismos se llevó a cabo con Verify_3D (Bowie, *et al.*, 1991; Luethy, *et al.*, 1992) y ProSA (Wiederstein y Sippl, 2007). Los modelados se presentan usando el *software* PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC).

La predicción de señales de localización nuclear (NLS) se llevó a cabo mediante los *software* ScanProsite (de Castro *et al.*, 2006) y WoLF PSORT (Horton *et al.*, 2007). Por su parte, la predicción de señales de localización nucleolares (NoLSs) se llevó a cabo mediante el *software* NOD (Scott *et al.*, 2010; Scott *et al.*, 2011). Las señales de exportación nuclear (NES) se buscaron por medio de los predictores LocNES (Xu *et al.*, 2015), NetNES (la Cour *et al.*, 2004) y ValidNES (Fu *et al.*, 2013). La predicción de motivos de unión a ARN se llevó a cabo utilizando el *software* FastRNABindR (Wang y Brown, 2006) y Pprint (Kumar *et al.*, 2008). La búsqueda de dominios WG/GW, se realizó mediante el *software* AGOS (Zielezinski y Karlowski, 2011). Por su parte, se utilizaron las bases de datos Pfam y Prosite (Kipreos y Pagano, 2000; Kumar y Paietta, 1998) para la búsqueda de motivos F-box sobre la secuencia de la 24K^{CPsV}.



BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Abd-Hamid, N., Ahmad-Fauzi, M., Zainal, Z., 2020. Diverse and dynamic roles of F-box proteins in plant biology. *Planta* 251, 68.
- Achkar, N.P., Cambiagno, D.A., and Manavella, P.A., 2016. miRNA Biogenesis: A Dynamic Pathway. *Trends in Plant Science* 21, 1034–1044.
- Achkar, N.P., Cho, S.K., Poulsen, C., 2018. A quick HYL1-dependent reactivation of microRNA production is required for a proper developmental response after extended periods of light deprivation. *Dev. Cell*, 46, 236–247 e236.
- Addo-Quaye C, Eshoo TW, Bartel DP, Axtell MJ. 2008. Endogenous siRNA and miRNA targets identified by sequencing of the Arabidopsis degradome. *Curr Biol* 18: 758–762.
- Addo-Quaye, C., Snyder, J.A., Park, Y.B., Li, Y.F., Sunkar, R., and Axtell, M.J., 2009. Sliced microRNA targets and precise loop-first processing of MIR319 hairpins revealed by analysis of the *Physcomitrella patens* degradome. *Rna* 15, 2112–2121.
- Alam MM, Tanaka T, Nakamura H, Ichikawa H., 2015. Overexpression of a rice heme activator protein gene (OsHAP2E) confers resistance to pathogens, salinity and drought, and increases photosynthesis and tiller number. *Plant Biotechnol J* 13:85–96.
- Allen E, Xie Z, Gustafson AM, Carrington JC., 2005. microRNA-directed phasing during transacting siRNA biogenesis in plants. *Cell* 121:207–221.
- Alvarado VY, Scholthof HB., 2011. AGO2: a new argonaute compromising plant virus accumulation. *Front Plant Sci* 2:112.
- Amin, I., Patil, B.L., Briddon, R.W., Mansoor, S. and Fauquet, C.M., 2011. A common set of developmental miRNAs are upregulated in *Nicotiana benthamiana* by diverse begomoviruses. *Virol. J.* 8, 143.
- Axtell, M.J., 2008. Evolution of microRNAs and their targets: are all microRNAs biologically relevant? *Biochim Biophys Acta* 1779, 725–734.
- Axtell, M. J., 2013. Classification and Comparison of Small RNAs from Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), 137–159.
- Axtell, M.J., and Bowman, J.L., 2008. Evolution of plant microRNAs and their targets. *Trends Plant Sci* 13, 343–349.
- Azevedo, J., 2010. Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen encoded GW repeat protein. *Genes Dev.* 24, 904–915.
- Bahieldin A, Atef A, Edris S, Gadalla NO., 2016. Ethylene responsive transcription factor ERF109 retards PCD and improves salt tolerance in plant. *BMC Plant Biol* 16:216.
- Bajczyk, M.; Bhat, S.S.; Szewc, L.; Szweykowska-Kulinska, Z.; Jarmolowski, A.; Dolata, J., 2019. Novel nuclear functions of Arabidopsis ARGONAUTE1: Beyond RNA interference. *Plant Physiol.*, 179, 1030–1039.
- Ballif J, Endo S, Kotani M, MacAdam J, Wu Y., 2011. Over-expression of HAP3b enhances primary root elongation in Arabidopsis. *Plant Physiol Biochem* 49:579–583.
- Barkan A., 2009. Genome-wide analysis of RNA-protein interactions in plants. *Methods Mol Biol.*;553:13–37.
- Baumberger N, Tsai CH, Lie M, Havecker E, Baulcombe DC., 2007. The Pterovirus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Curr Biol* 17(18):1609–1614.
- Bayne, E.H., Rakitina, D.V., Morozov, S.Y., Baulcombe, D.C., 2005. Cell-to-cell movement of potato potexvirus X is dependent on suppression of RNA silencing. *Plant J.* 44, 471–482.
- Bazzini, A.A., Hopp, H.E., Beachy, R.N. and Asurmendi, S., 2007. Infection and coaccumulation of tobacco mosaic virus proteins alter microRNA levels, correlating with symptom and plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 12 157–12 162.
- Bazzini, A.A., Almasia, N.I., Manacorda, C.A., Mongelli, V.C., Conti, G., Maroniche, G.A., Rodriguez, M.C., Distefano, A.J., Hopp, H.E., del Vas, M. and Asurmendi, S., 2009. Virus infection elevates transcriptional activity of miR164a promoter in plants. *BMC Plant Biol.* 9, 152.
- Bednenko, J., Noto, T., DeSouza, L.V., Siu, K.W., Pearlman, R.E., Mochizuki, K., Gorovsky, M.A., 2009. Two GW repeat proteins interact with *Tetrahymena thermophila* argonaute and promote genome rearrangement. *Mol Cell Biol* 29, 5020–5030.
- Beijerinck, M.W., 1898. Concerning a contagium vivum fluidum as cause of the spot disease of tobacco leaves. *Phytopathological Classics* 7, 33–52.
- Ben Chaabane, S., Liu, R., Chinnusamy, V., Kwon, Y., Park, J.-h., Kim, S.Y., Zhu, J.-K., Yang, S.W., and Lee, B.-h., 2013. STA1, an Arabidopsis pre-mRNA processing factor 6 homolog, is a new player involved in miRNA

- biogenesis. *Nucleic Acids Research* 41, 1984-1997.
- Beñatena, H. P. & Portillo, M. M., 1984. Natural spread of psorosis in sweet orange seedlings. In *Proc 9th Conf of IOCV*, pp. 159-164. Edited by T. Garnsey S. M., L. W. and Dodds, J. A. Riverside, Clifornia, USA.
- Birnboim, H.C., Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523
- Blevins, T., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P.V., Beknazariants, D., Si-Ammour, A., Park, H.S., Vazquez, F., Robertson, D., Meins, F., Jr., Hohn, T., 2006. Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Res* 34, 6233-6246.
- Bologna, N.G., Mateos, J.L., Bresso, E.G., and Palatnik, J.F., 2009. A loop-to-base processing mechanism underlies the biogenesis of plant microRNAs miR319 and miR159. *Embo J* 28, 3646-3656.
- Bologna, N.G., Schapire, A.L., and Palatnik, J.F., 2013a. Processing of plant microRNA precursors. *Brief Funct Genomics* 12, 37-45.
- Bologna, N.G., Schapire, A.L., Zhai, J., Chorostecki, U., Boisbouvier, J., Meyers, B.C., and Palatnik, J.F., 2013b. Multiple RNA recognition patterns during microRNA biogenesis in plants. *Genome Res* 23, 1675-1689.
- Bologna, N.G. and Voinnet, O., 2014. The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in *Arabidopsis*. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65, 473–503.
- Bologna, N.G., Iselin, R., Abriata, L.A., Sarazin, A., Pumplín, N., Jay, F., Grentzinger, T., Dal Peraro, M. and Voinnet, O., 2018. Nucleocytoplasmic shuttling of ARGONAUTE1 prompts a revised model of the plant micro- RNA pathway. *Mol. Cell*, 69, 709–719 e705.
- Borniego MB, Karlin D, Pena EJ, Robles Luna G, Garcia ML., 2016. Bioinformatic and mutational analysis of ophiovirus movement proteins, belonging to the 30 K superfamily. *Virology* 498:172–180.
- Borniego MB, 2017. Caracterización mutacional y funcional de las proteínas de movimiento de ophiovirus, Depratamento de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.
- Bortolamiol D, Pazhouhandeh M, Marrocco K, Genschik P, Ziegler- Graff V., 2007. The polerovirus F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. *Curr Biol* 17(18):1615– 1621.
- Boualem, A., 2016. The battle for survival between viruses and their host plants. *Curr. Opin. Virol.* 17, 32–38
- Boutet, S., Vazquez, F., Liu, J., Beclin, C., Fagard, M., Gratias, A., Morel, J.B., Crete, P., Chen, X., and Vaucheret, H., 2003. *Arabidopsis* HEN1: a genetic link between endogenous miRNA controlling development and siRNA controlling transgene silencing and virus resistance. *Curr Biol* 13, 843-848.
- Boutla, A., Delidakis, C., Livadaras, I., Tsagris, M. & Tabler, M., 2001. Short 5'-phosphorylated double-stranded RNAs induce RNA interference in *Drosophila*. *Curr Biol* 11, 1776-1780
- Bowie, J.U., Lüthy, R., Eisenberg, D., 1991. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science* 253, 164-170.
- Brousse C, Liu Q, Beauclair L, Deremetz A, Axtell MJ, Bouche N., 2014. A non-canonical plant microRNA target site. *Nucleic Acids Res* 42:5270–5279.
- Burdisso, P., Suarez, I.P., Bologna, N.G., Palatnik, J.F., Bersch, B., and Rasia, R.M., 2012. Second double-stranded RNA binding domain of dicer-like ribonuclease 1: structural and biochemical characterization. *Biochemistry* 51, 10159-10166.
- Burguán, J., 2011. Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci.* 16, 265–272
- Carbonell, A., Fahlgren, N., Garcia-Ruiz, H., Gilbert, K.B., Montgomery, T.A., Nguyen, T., Cuperus, J.T., and Carrington, J.C., 2012. Functional analysis of three *Arabidopsis* ARGONAUTES using slicer-defective mutants. *Plant Cell* 24, 3613-3629.
- Carbonell, A. and Carrington, J.C., 2015. Antiviral roles of plant ARGONAUTES. *Curr. Opin. Plant Biol.* 27, 111–117.
- Cardon GH, Höhmann S, Nettekheim K, Saedler H, Huijser P., 1997. Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* SBP-box gene SPL3: a novel gene involved in the floral transition. *Plant J* 12:367–377.
- Cardon G, Höhmann S, Klein J, Nettekheim K, Saedler H, Huijser P., 1999. Molecular characterisation of the *Arabidopsis* SBP-box genes. *Gene* 237(1):91–104.
- Carmo-Fonseca, M., Mendes-Soares, L., Campos, I., 2000. To be or not to be in the nucleolus. *Nat Cell Biol* 2, E107-112.
- Carthew, R.W., and Sontheimer, E.J., 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136, 642-655.
- Castillo-Gonzalez, C., 2015. Geminivirus-encoded TrAP suppressor inhibits the histone

- methyltransferase SUVH4/KYP to counter host defense. *eLife* 4, e06671
- Cedano, J., Aloy, P., Perez-Pons, J.A., Querol, E., 1997. Relation between amino acid composition and cellular location of proteins. *J Mol Biol* 266, 594-600.
- Chang, J.M., Di Tommaso, P., and Notredame, C., 2014. TCS: a new multiple sequence alignment reliability measure to estimate alignment accuracy and improve phylogenetic tree reconstruction. *Mol Biol Evol* 31, 1625-1637.
- Chapman EJ, Prokhnevsky AI, Gopinath K, Dolja VV, Carrington JC., 2004. Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev* 18:1179–1186.
- Chapman, E.J., and Carrington, J.C., 2007. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat Rev Genet* 8, 884-896.
- Chavez Montes, R.A., de Fatima Rosas-Cardenas, F., De Paoli, E., Accerbi, M., Rymarquis, L.A., Mahalingam, G., Marsch-Martinez, N., Meyers, B.C., Green, P.J., and de Folter, S., 2014. Sample sequencing of vascular plants demonstrates widespread conservation and divergence of microRNAs. *Nat Commun* 5, 3722.
- Chen J , Li WX , Xie D , Peng JR , Ding SW., 2004. Viral Virulence Protein Suppresses RNA Silencing–Mediated Defense but Upregulates the Role of MicroRNA in Host Gene Expression. *Plant Cell* 16:1302–1313.
- Chen J, Feng J, Liao Q, Chen S, Zhang J, Lang Q., 2012. Analysis of tomato microRNAs expression profile induced by Cucumovirus and Tobamovirus infections. *J Nanosci Nanotechnol* 12(1):143–150.
- Cho, S.K., Chaabane, S.B., Shah, P., Poulsen, C.P., and Yang, S.W., 2014. COP1 E3 ligase protects HYL1 to retain microRNA biogenesis. *Nature Communications* 5, 5867.
- Chorostecki, U., Crosa, V.A., Lodeyro, A.F., Bologna, N.G., Martin, A.P., Carrillo, N., Schommer, C., and Palatnik, J.F., 2012. Identification of new microRNA-regulated genes by conserved targeting in plant species. *Nucleic Acids Res* 40, 8893-8904.
- Chorostecki, U., Moro, B., Rojas, A. M. L., Debernardi, J. M., Schapire, A. L., Notredame, C., & Palatnik, J. F., 2017. Evolutionary footprints reveal insights into plant microRNA biogenesis. *Plant Cell*, 29(6), 1248–1261.
- Chou, K.C., 2001. Prediction of protein cellular attributes using pseudo-amino acid composition. *Proteins* 43, 246-255.
- Chou, K.C., Elrod, D.W., 1999. Protein subcellular location prediction. *Protein Eng* 12, 107-118.
- Costa, N., Plata, M. I., Ramos, F., Fernández, P., & Hauteville, C., 2013. Aerial spread of Citrus psorosis virus (CPsV) by insects in Argentina. En: *Proceedings of the 19th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*, 2013, Abstract, IOCV Conference, South Africa
- Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE., 2004. WebLogo: A sequence logo generator, *Genome Research*, 14:1188-1190
- Csorba, T., Kontra, L. and Burgyán, J., 2015. Viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology* 479, 85–103.
- Cuellar, W.J., 2009. Elimination of antiviral defense by viral RNase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 10354–10358
- Cui LG, Shan JX, Shi M, Gao JP, Lin HX., 2014. The miR156-SPL9-DFR pathway coordinates the relationship between development and abiotic stress tolerance in plants. *Plant J* 80(6):1108–1117.
- Cuperus, J.T., Fahlgren, N., and Carrington, J.C., 2011. Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *Plant Cell* 23, 431-442.
- Dai X, Zhao PX., 2011. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Res* 39:W155–W159.
- Danós E., 1990. La psorosis de los cítricos: la epidemia en curso en Argentina y el desafío de su control. En *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, International Foundation for Science (IFS) e Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) edn: pp 265–277
- de Castro, E., Sigrist, C.J., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P.S., Gasteiger, E., Bairoch, A., Hulo, N., 2006. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res* 34, W362-365.
- Debernardi JM, Rodriguez RE, Mecchia MA, Palatnik JF., 2012. Functional Specialization of the Plant miR396 Regulatory Network through Distinct MicroRNA–Target Interactions. *PLoS Genet* 8(1): e1002419.
- Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K.D., Carrington, J.C., Voinnet, O., 2006. Hierarchical action and inhibition of plant dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313, 68–71.
- Derrick, K.S., Bransky, R.H., Lee, R.F., Timmer, L.W., Garnsey, S.M., Nguyen, T.K., 1988. Two components associated with the Citrus ringspot virus, in: L. W. Timmer, G., S. M. and Navarro,

- L. (Ed.), Proc10 th Conf IOCV, Riverside, California, USA, pp. 340-342.
- Derrien, B., 2018. A suppressor screen for AGO1 degradation by the viral F-box P0 protein uncovers a role for AGO DUF1785 in sRNA duplex unwinding. *Plant Cell* 30, 1353–1374.
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Weijers D, Lechner E., 2005. Plant development is regulated by a family of auxin receptor F-box proteins. *Dev Cell* 9:109–119.
- Di Tommaso, P., Moretti, S., Xenarios, I., Orobittg, M., Montanyola, A., Chang, J.M., Taly, J.F., Notredame, C., 2011. T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Res.* 39, W13-17.
- Ding, L., Spencer, A., Morita, K., Han, M., 2005. The developmental timing regulator AIN-1 interacts with miRISCs and may target the argonaute protein ALG-1 to cytoplasmic P bodies in *C. elegans*. *Mol Cell* 19, 437-447.
- Ding, S.W., Voinnet, O., 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130, 413-426.
- Dong, Z., Han, M.H., and Fedoroff, N., 2008. The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 9970-9975.
- Dower, W.J., Miller, J.F., Ragsdale, C.W., 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16, 6127-6145.
- Du Z, Xiao D, Wu J, Jia D, Yuan Z., 2011. p2 of rice stripe virus (RSV) interacts with OsSGS3 and is a silencing suppressor. *Mol Plant Pathol* 12(8):808–814.
- Duan, C.-G., 2012. Suppression of Arabidopsis ARGONAUTE1-mediated slicing, transgene-induced RNA silencing, and DNA methylation by distinct domains of the cucumber mosaic virus 2b protein. *Plant Cell* 24, 259–274
- Dunoyer P , Lecellier CH , Parizotto EA , Himber C , Voinnet O., 2004. ETRACTED: Probing the MicroRNA and Small Interfering RNA Pathways with Virus-Encoded Suppressors of RNA Silencing. *Plant Cell* 16:1235–1250.
- Dunoyer, P., Schott, G., Himber, C., Meyer, D., Takeda, A., Carrington, J.C., and Voinnet, O., 2010. Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. *Science* 328, 912-916.
- Eamens, A.L., Smith, N.A., Curtin, S.J., Wang, M.-B., and Waterhouse, P.M., 2009. The Arabidopsis thaliana double-stranded RNA binding protein DRB1 directs guide strand selection from microRNA duplexes. *Rna* 15, 2219-2235.
- Eamens, A.L., Wook Kim, K., and Waterhouse, P.M., 2012. DRB2, DRB3 and DRB5 function in a non-canonical microRNA pathway in Arabidopsis thaliana. *Plant Signal. Behav.* 7, 1224–1229.
- Eamens, A.L., 2012. DRB2 is required for microRNA biogenesis in Arabidopsis thaliana. *PLoS ONE* 7, e35933
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. & Tuschl, T., 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- El-Shami, M., Pontier, D., Lahmy, S., Braun, L., Picart, C., Vega, D., Hakimi, M.A., Jacobsen, S.E., Cooke, R., Lagrange, T., 2007. Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes Dev* 21, 2539-2544.
- Elulio, A., Triteschler, F., Izaurrealde, E., 2009. The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing. *RNA* 15, 1433-1442.
- Fahlgren N, Howell MD, Kasschau KD, Chapman EJ, Sullivan CM, Cumbie JS, Givan SA, Law TF, Grant SR, Dangel JL, 2007. High-throughput sequencing of Arabidopsis microRNAs: Evidence for frequent birth and death of MIRNA genes. *PLoS ONE* 2: e219
- Fahlgren N, Jogdeo S, Kasschau KD, Sullivan CM, Chapman EJ, Laubinger S, Smith LM, Dasenko M, Givan SA, Weigel D, 2010. MicroRNA gene evolution in Arabidopsis lyrata and Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 22: 1074–1089.
- Fang, Y., and Spector, D.L., 2007. Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living Arabidopsis plants. *Curr Biol* 17, 818-823.
- Fang, X., Cui, Y., Li, Y. and Qi, Y., 2015a. Transcription and processing of primary microRNAs are coupled by Elongator complex in Arabidopsis. *Nat. Plants*, 1, 15075.
- Fang, X. and Qi, Y., 2016. RNAi in plants: an argonaute-centered view. *Plant Cell*, 28, 272–285.
- Fang, Y.-N.; Zheng, B.-B.; Wang, L.; Yang, W.; Wu, X.-M.; Xu, Q.; Guo, W.-W., 2016. High-throughput sequencing and degradome analysis reveal altered expression of miRNAs and their targets in a male-sterile cybrid pummelo (*Citrus grandis*). *BMC Genomics*, 17, 591.
- Fawcett, H. S. and Klotz, L. J., 1938. Types and symptoms of psorosis and psorosis-like diseases of citrus. *Phytopathology* 28, 670.

- Fawcett, H. S., 1932. New angles on treatment of bark diseases of citrus. *California Citrograph* 17, 406-408.
- FEDERCITRUS, 2018. La Actividad Citrícola Argentina 2018: Federación Argentina del Citrus.
- Frank, F., Hauver, J., Sonenberg, N., and Nagar, B., 2012. Arabidopsis Argonaute MID domains use their nucleotide specificity loop to sort small RNAs. *The EMBO Journal* 31, 3588-3595.
- Fu, S.-C., Huang, H.-C., Horton, P., Juan, H.-F., 2013. ValidNESs: a database of validated leucine-rich nuclear export signals. *Nucleic Acids Research* 41, D338-D343.
- Garcia, M. L., Grau, O. & Sarachu, A. N. 1991. Citrus psorosis is probably caused by a bipartite ssRNA virus. *Res Virol* 142, 303-311.
- García, M.L., Dal Bo, E., Grau, O. and Milne, R.G. 1994. The closely related citrus ringspot and citrus psorosis viruses have particles of novel filamentous morphology. *J. Gen. Virol.* 75 (Pt 12), 3585–3590.
- García ML, Bo ED, da Graca JV, Gago-Zachert S. 2017. ICTV virus taxonomy profile: ophioviridae. *J Gen Virol* 98:1161–1162.
- Garnsey, S.M., Timmer, L.W., 1980. Mechanical transmissibility of Citrus ringspot virus isolates from Florida, Texas, and California. In: Calavan, E.C., Garnsey, S.M.,
- Gascioli, V., Mallory, A.C., Bartel, D.P., and Vaucheret, H. 2005. Partially redundant functions of Arabidopsis DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-acting siRNAs. *Curr Biol* 15, 1494-1500.
- Gómez CA. 2019. Metodologías de diagnóstico de CPsV (psorosis) en cítricos. (3200). https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_concordia_metodologia_de_diagnostico_de_psorosis_en_citricos.pdf. Accessed 20 Nov 2019
- Gonzalez, I., Martinez, L., Rakitina, D.V., Lewsey, M.G., Atencio, F.A., Llave, C., Kalinina, N.O., Carr, J.P., Palukaitis, P., Canto, T., 2010. Cucumber mosaic virus 2b protein subcellular targets and interactions: their significance to RNA silencing suppressor activity. *Mol Plant Microbe Interact* 23, 294-303
- Goodin, M.M., Dietzgen, R.G., Schichnes, D., Ruzin, S., Jackson, A.O., 2002. pGD vectors: versatile tools for the expression of green and red fluorescent protein fusions in agroinfiltrated plant leaves. *Plant J: Cell Mol. Biol.* 31, 375–383.
- Gottwald, T.R., Pale, S.R., Miao, H., Seyran, M., Skaria, M., da Graca, J.V., 2005. Assessment of the possibility of natural spread of citruspsorosis disease. , 16th International Organization of Citrus Virologists (IOCV) Conference, Riverside, pp. 240–250.
- Grigg, S.P., Canales, C., Hay, A. and Tsiantis, M. 2005. SERRATE coordinates shoot meristem function and leaf axial patterning in Arabidopsis. *Nature*, 437, 1022–1026.
- Ha, M., and Kim, V.N. 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 509-524.
- Haas, G. 2008. Nuclear import of CaMV P6 is required for infection and suppression of the RNA silencing factor DRB4. *EMBO J.* 27, 2102–2112
- Hamilton CM:, 1997. A binary-BAC system for plant transformation with high-molecular-weight DNA. *Gene*, 200:107–116.
- Han, M. 2004. 'The Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation', 101(4), pp. 1093–1098.
- Harrison, B.D., Robinson, D.J., 2005. Another quarter century of great progress in understanding the biological properties of plant viruses. *Ann. Appl. Biol.*
- Harvey JJW, Lewsey MG, Patel K, Westwood J. 2011. An antiviral defense role of AGO2 in plants. *PLoS One* 6(1):e14639.
- He, X.J., Hsu, Y.F., Zhu, S., Wierzbicki, A.T., Pontes, O., Pikaard, C.S., Liu, H.L., Wang, C.S., Jin, H., Zhu, J.K., 2009. An effector of RNA-directed DNA methylation in arabidopsis is an ARGONAUTE 4- and RNA-binding protein. *Cell* 137, 498-508.
- Henderson, I.R., Zhang, X., Lu, C., Johnson, L., Meyers, B.C., Green, P.J., and Jacobsen, S.E. 2006. Dissecting Arabidopsis thaliana DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nat Genet* 38, 721-725.
- Hiraguri, A., Itoh, R., Kondo, N., Nomura, Y., Aizawa, D., Murai, Y., Koiwa, H., Seki, M., Shinozaki, K., and Fukuhara, T. 2005. Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol* 57, 173-188.
- Hiscox, J.A., 2007. RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. *Nat Rev Microbiol* 5, 119-127.
- Holen, T., Amarzguoui, M., Wiiger, M. T., Babaie, E. & Prydz, H. 2002. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res* 30, 1757-1766.
- Hood, E.E., Helmer, G.L., Fraley, R.T. and Chilton, M.-D., 1986a. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in

- a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J. Bacteriol.* 168, 1291-1301.
- Horton, P., Park, K.J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C.J., Nakai, K., 2007. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res* 35, W585-587.
- Hou C, Lee W, Chou H, Chen A, Chou S, Chen H., 2016. Global analysis of truncated RNA ends reveals new insights into ribosome stalling in plants. *The Plant Cell* 28:2398–2416.
- Huang, Y. and Li, Y. 2018. Secondary siRNAs rescue virusinfected plants. *Nat. Plants* 4, 136
- Iki, T., Yoshikawa, M., Nishikiori, M., Jaudal, M.C., Matsumoto-Yokoyama, E., Mitsuhara, I., Meshi, T., and Ishikawa, M. 2010. In Vitro Assembly of Plant RNA-Induced Silencing Complexes Facilitated by Molecular Chaperone HSP90. *Molecular Cell* 39, 282-291.
- Iki, T.; Clery, A.; Bologna, N.G.; Sarazin, A.; Brosnan, C.A.; Pumplin, N.; Allain, F.H.T.; Voinnet, O., 2018. Structural flexibility enables alternative maturation, ARGONAUTE sorting and activities of miR168, a global gene silencing regulator in plants. *Mol. Plant*, 11, 1008–1023.
- Incarbone, M. and Dunoyer, P., 2013. RNA silencing and its suppression: novel insights from in planta analyses. *Trends Plant Sci* 18, 382-392.
- Iwata, Y., Takahashi, M., Fedoroff, N. V., & Hamdan, S. M. (2013). Dissecting the interactions of SERRATE with RNA and DICER-LIKE 1 in Arabidopsis microRNA precursor processing. *Nucleic Acids Research*, 41(19), 9129–9140.
- Jagtap S, Shivaprasad PV., 2014. Diversity, expression and mRNA targeting abilities of Argonaute-targeting miRNAs among selected vascular plants. *BMC Genomics* 15(1):1049.
- Jakymiw, A., Lian, S., Eystathiou, T., Li, S., Satoh, M., Hamel, J.C., Fritzler, M.J., Chan, E.K., 2005. Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat Cell Biol* 7, 1267-1274.
- Jamous, R.M. 2011. The helper component-proteinase of the Zucchini yellow mosaic virus inhibits the Hua Enhancer 1 methyltransferase activity in vitro. *J. Gen. Virol.* 92, 2222–2226
- Jauvion, V., Rivard, M., Bouteiller, N., Elmayan, T., and Vaucheret, H. 2012. RDR2 Partially Antagonizes the Production of RDR6-Dependent siRNA in Sense Transgene-Mediated PTGS. *PLoS ONE* 7, e29785.
- Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Bartel, B. 2006. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol* 57, 19-53.
- Jones P, Binns D, Chang HY, Fraser M., 2014. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics* 30:1236–1240
- Kamanu et al., 2013. Exploration of miRNA families for hypotheses generation
- Karimi, M., Inze, D., Depicker, A., 2002. GATEWAY vectors for Agrobacterium mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 7, 193–195.
- Karlowski, W.M., Zielezinski, A., Carrere, J., Pontier, D., Lagrange, T., Cooke, R., 2010. Genome-wide computational identification of WG/GW Argonaute-binding proteins in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res* 38, 4231-4245.
- Kasschau, K.D., Carrington, J.C., 1998. A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95, 461-470.
- Kasschau KD , Xie Z , Allen E , Llave C , Chapman EJ , Krizan KA , Carrington JC., 2003. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA uncton. *Dev Cell* 4:205–217.
- Keene, J. D., Komisarow, J. M. and Friedersdorf, M. B. 2006. 'RIP-Chip: The isolation and identification of mRNAs, microRNAs and protein components of ribonucleoprotein complexes from cell extracts', *Nature Protocols*, 1(1), pp. 302–307.
- Kim, V.N., Han, J., and Siomi, M.C. 2009. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 126-139.
- Kipreos ET, Pagano M., 2000. The F-box protein family. *Genome Biol* 1(5):reviews/3002.3001
- Klein J, Saedler H, Huijser P., 1996. A new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the Antirrhinum majus floral meristem identity gene Squamosa. *Mol Gen Genet* 250(1):7–16.
- Kormelink, R., Garcia, M.L., Goodin, M., Sasaya, T., Haenni, A.L., 2011. Negative-strand RNA viruses: the plant-infecting counterparts. *Virus Res.* 162, 184-202.
- Krzywinski, M., Schein, J., Birol, I., Connors, J., Gascoyne, R., Horsman, D., Jones, S.J., and Marra, M.A. 2009. Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res* 19, 1639-1645.
- Kumar A, Paietta JV., 1998. An additional role for the F-box motif: gene regulation within the Neurospora crassa sulfur control network. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(5):2417–2422.
- Kumar, M., Gromiha, M.M., Raghava, G.P., 2008. Prediction of RNA binding sites in a protein using SVM and PSSM profile. *Proteins* 71, 189-194.
- Kurihara, Y., Takashi, Y., and Watanabe, Y. 2006. The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *Rna* 12, 206-212.

- Kurihara, Y., and Watanabe, Y. 2004. Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12753-12758.
- Kwak, P.B., and Tomari, Y. 2012. The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat Struct Mol Biol* 19, 145-151.
- Kwon, S.C., Nguyen, Tuan A., Choi, Y.-G., Jo, Myung H., Hohng, S., Kim, V.N., and Woo, J.-S. 2016. Structure of Human DROSHA. *Cell* 164, 81-90.
- la Cour, T., Kierner, L., Molgaard, A., Gupta, R., Skriver, K., Brunak, S., 2004. Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel* 17, 527-536.
- Langmead B., 2010. Aligning short sequencing reads with Bowtie. *Curr Protoc Bioinform* 11:11-17.
- Laubinger, S., Sachsenberg, T., Zeller, G., Busch, W., Lohmann, J.U., Ratsch, G., and Weigel, D. 2008. Dual roles of the nuclear cap-binding complex and SERRATE in pre-mRNA splicing and microRNA processing in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 8795-8800.
- Lee, R.C.; Feinbaum, R.L.; Ambros, V., 1993. The C.elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 75, 843-854.
- Lee H, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ., 2003. Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1 represents a functionally specialized subunit of the CCAAT binding transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2152-2156.
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB., 2003. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*;115:787-798.
- Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J., and Chen, X. 2005. Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. *Curr Biol* 15, 1501-1507.
- Li,Y., Fu,Y., Ji,L., Wu,C. and Zheng,C. 2010. Characterization and expression analysis of the Arabidopsis mir169 family. *Plant Sci.*, 178, 271-280.
- Li, S., Yang, X., Wu, F. and He, Y. 2012. HYL1 controls the miR156-mediated juvenile phase of vegetative growth. *J. Exp. Bot.* 63, 2787-2798.
- Li S, Le B, Ma X, Li S, You C., 2016. Biogenesis of phased siRNAs on membrane-bound polysomes in Arabidopsis. *ELife* 5:e22750.
- Li, A., Li, G., Zhao, Y., 2018. Combined small RNA and gene expression analysis revealed roles of miRNAs in maize response to rice black-streaked dwarf virus infection. *Sci Rep* 8, 13502
- Li and Wang, 2019. RNA-Targeted Antiviral Immunity: More Than Just RNA Silencing. *Trends in Microbiology*
- Liang C, Liu H, Hao J, Li J, Luo L., 2019. Expression profiling and regulatory network of cucumber microRNAs and their putative target genes in response to cucumber green mottle mosaic virus infection. *Arch Virol* 164:1121-1134
- Liu JX, Howell SH., 2010. Endoplasmic reticulum protein quality control and its relationship to environmental stress responses in plants. *Plant Cell* 22:2930-2942.
- Liu, C., Axtell, M.J., and Fedoroff, N.V., 2012. The helicase and RNaseIIIa domains of Arabidopsis Dicer-Like1 modulate catalytic parameters during microRNA biogenesis. *Plant Physiol* 159, 748-758.
- Liu Y, Wang L, Chen D, Wu X., 2014. Genome-wide comparison of microRNAs and their targeted transcripts among leaf, flower and fruit of sweet orange. *BMC Genomics* 15(1):695
- Lobbies, D., Rallapalli, G., Schmidt, D.D., Martin, C., and Clarke, J., 2006. SERRATE: a new player on the plant microRNA scene. *EMBO Rep* 7, 1052-1058.
- Lorenz, R., Bernhart, S.H., Honer Zu Siederdissen, C., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P.F., and Hofacker, I.L., 2011. ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms Mol Biol* 6, 26.
- Lu, S. and Cullen, B. R., 2004. 'Adenovirus VA1 Noncoding RNA Can Inhibit Small Interfering RNA and MicroRNA Biogenesis', *Journal of Virology*, 78(23), pp. 12868-12876.
- Luethy, R., Bowie, J.U., Eisenberg, D., 1992. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature* 356, 83-85.
- Ma, E., Zhou, K., Kidwell, M.A., and Doudna, J.A. 2012. Coordinated Activities of Human Dicer Domains in Regulatory RNA Processing. *Journal of Molecular Biology* 422, 466-476.
- Macara, I.G., 2001. Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev* 65, 570-594, table of contents.
- Madeira F, Park YM, Lee J, 2019. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*. Jul;47(W1):W636-W641.
- Mallory, A., and Vaucheret, H. 2010. Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. *Plant Cell* 22, 3879-3889.
- Manavella, P.A., Hagmann, J., Ott, F., Laubinger, S., Franz, M., Macek, B., and Weigel, D. 2012a. Fast-Forward Genetics Identifies Plant CPL Phosphatases as Regulators of miRNA Processing Factor HYL1. *Cell* 151, 859-870.
- Manavella, P.A., Koenig, D., and Weigel, D. 2012b. Plant secondary siRNA production

- determined by microRNA-duplex structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 2461-2466.
- Manavella, P.A., Koenig, D., Rubio-Somoza, I., Burbano, H.A., Becker, C. and Weigel, D. 2013. Tissue-specific silencing of *Arabidopsis* SU(VAR)3-9 HOMOLOG8 by miR171a. *Plant Physiol.* 161, 805–812.
- Manavella, P. A., Yang, S. W., & Palatnik, J. 2019. Keep calm and carry on: miRNA biogenesis under stress. *Plant Journal*, Vol. 99, pp. 832–843.
- Marmisolle, F.E., García, M.L. & Reyes, C.A. 2018. RNA-binding protein immunoprecipitation as a tool to investigate plant miRNA processing interference by regulatory proteins of diverse origin. *Plant Methods* 14, 9.
- Martín S, López C, García ML, Naum-Onganía G, Grau O, Flores R, Moreno P, Guerri J. 2005. The complete nucleotide sequence of a Spanish isolate of Citrus psorosis virus: comparative analysis with other ophioviruses. *Arch Virol.* 150:167-176.
- Martin, S., Garcia, M.L., Troisi, A., Rubio, L., Legarreta, G., Grau, O., Alioto, D., Moreno, P. and Guerri, J. 2006. Genetic variation of populations of Citrus psorosis virus. *J. Gen. Virol.* 87, 3097–3102.
- Mateos, J.L., Bologna, N.G., Chorostecki, U., and Palatnik, J.F. 2010. Identification of microRNA processing determinants by random mutagenesis of *Arabidopsis* MIR172a precursor. *Curr Biol* 20, 49-54.
- Matzke, M.A. and Mosher, R.A. 2014. RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat. Rev. Genet.* 15, 394
- Meyers, B.C., Axtell, M.J., Bartel, B., Bartel, D.P., Baulcombe, D., Bowman, J.L., Cao, X., Carrington, J.C., Chen, X., Green, P.J., Griffiths-Jones, S., Jacobsen, S.E., Mallory, A.C., Martienssen, R.A., Poethig, R.S., Qi, Y., Vaucheret, H., Voinnet, O., Watanabe, Y., Weigel, D., and Zhu, J.K. 2008. Criteria for Annotation of Plant MicroRNAs. *Plant Cell*.
- Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C., 2008. Sorting of small RNAs into *Arabidopsis* argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* 133, 116-127
- Milne, R. G., Garcia, M. L. & Grau, O. 2000. Genus Ophiovirus. In *Virus Taxonomy Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 627-631. Edited by M. H. V. van Regenmortel, Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R. and Wickner, R. B. San Diego, USA: Academic Press.
- Milne, R.G., García, M.L. and Moreno, P. 2003. Citrus psorosis virus. Association of Applied Biologists. Descriptions of Plant Viruses.
- Moissiard, G., and Voinnet, O. 2006. RNA silencing of host transcripts by cauliflower mosaic virus requires coordinated action of the four *Arabidopsis* Dicer-like proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19593-19598.
- Montgomery, T.A., Howell, M.D., Cuperus, J.T., Li, D., Hansen, J.E., Alexander, A.L., Chapman, E.J., Fahlgren, N., Allen, E., and Carrington, J.C. 2008a. Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell* 133, 128-141
- Montgomery, T.A., Yoo, S.J., Fahlgren, N., Gilbert, S.D., Howell, M.D., Sullivan, C.M., Alexander, A., Nguyen, G., Allen, E., Ahn, J.H., 2008b. AGO1-miR173 complex initiates phased siRNA formation in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20055-20062
- Moreno P, Guerri J, García ML. 2015. The psorosis disease of citrus: a pale light at the end of the tunnel. *J Cit Pathol.* [iocv_journalcitruspathology_28860](#).
- Moro, B., Chorostecki, U., Arikiti, S., Suarez, I. P., Hobartner, C., Rasia, R. M., Palatnik, J. F. 2018. Efficiency and precision of microRNA biogenesis modes in plants. *Nucleic Acids Research*, 46(20), 10709–10723.
- Moro Belen, Rojas, A. M. L. and Palatnik, J. F. 2019. 'Detection of MicroRNA Processing Intermediates Through', 1932.
- Mu J, Tan H, Hong S, Liang Y, Zuo J., 2013. *Arabidopsis* transcription factor genes NF-YA1, 5, 6, and 9 play redundant roles in male gametogenesis, embryogenesis, and seed development. *Mol Plant* 6:188–201.
- Nakai, K., Horton, P., 1999. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* 24, 34-36.
- Nakai, K., 2000. Protein sorting signals and prediction of subcellular localization. *Adv Protein Chem* 54, 277-344
- Nakashima, H., Nishikawa, K., 1994. Discrimination of intracellular and extracellular proteins using amino acid composition and residue-pair frequencies. *J Mol Biol* 238, 54-61.
- Naqvi, A.R., Haq, Q.M. and Mukherjee, S.K. 2010. MicroRNA profiling of tomato leaf curl New Delhi virus (toLCDNV) infected tomato leaves indicates that deregulation of mir159/319 and mir172 might be linked with leaf curl disease. *Virol. J.* 7, 281.
- Naum-Onganía G, Gago-Zachert S, Peña EJ., 2003. Citrus psorosis virus RNA 1 is of negative polarity and potentially encodes in its

- complementary strand a 24 K protein of unknown function and 280 K putative RNA dependent RNA polymerase. *Virus Res* 96:49–61.
- Navarro, L., Juárez, J., Ballester, J. F. & Pina, J. A. 1980. Elimination of Some Citrus Pathogens Producing Psorosis-like Leaf Symptoms, by Shoot-tip Grafting in vitro. In *Proc 8th Conf IOCV*, pp. 162-166. Edited by E. C. Calavan, Garnsey, S. M. and Timmer, L. W. Riverside, California, USA.
- Nizami, Z.F., Deryusheva, S., Gall, J.G., 2010. Cajal bodies and histone locus bodies in *Drosophila* and *Xenopus*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 75, 313-320.
- Okano, Y. 2014. In planta recognition of a doublestranded RNA synthesis protein complex by a potexviral RNA silencing suppressor. *Plant Cell* 26, 2168–2183
- Padmanabhan MS, Ma S, Burch-Smith TM, Czymmek K., 2013. Novel positive regulatory role for the SPL6 transcription factor in the N TIR-NB-LRR receptor-mediated plant innate immunity. *PLoS Pathog* 9:e1003235
- Pagnussat GC, Yu HJ, Ngo QA, Rajani S., 2005. Genetic and molecular identification of genes required for female gametophyte development and function in *Arabidopsis*. *Development* 132:603–614.
- Palatnik, J.F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J.C., and Weigel, D. 2003. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* 425, 257-263.
- Pandey, P., Srivastava, P. K., & Pandey, S. P. 2019. Prediction of plant miRNA targets. *Methods in Molecular Biology*, 1932, 99–107.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., and Chen, X. 2002. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* 12, 1484-1495.
- Partridge, J.F., DeBeauchamp, J.L., Kosinski, A.M., Ulrich, D.L., Hadler, M.J., Noffsinger, V.J., 2007. Functional separation of the requirements for establishment and maintenance of centromeric heterochromatin. *Mol Cell* 26, 593-602.
- Pazhouhandeh M, Dieterle M, Marrocco K, Lechner E, Berry B, Brault V, Hemmer O, Kretsch T, Richards KE, Genschik P, Ziegler-Graff V., 2006. F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(6):1994.
- Pei, J., Kim, B.H., Tang, M., Grishin, N.V., 2007. PROMALS web server for accurate multiple protein sequence alignments. *Nucleic Acids Res.* 35, W649-652.
- Peña EJ, Robles Luna G, Zaneck MC, Borniego MB., 2012. Citrus psorosis and mirafiori lettuce big-vein ophiovirus coat proteins localize to the cytoplasm and self interact in vivo. *Virus Res* 170:34–43.
- Pérez-Cañamás M, Hernández C. 2015. Key importance of small RNA binding for the activity of a glycine-tryptophan (GW) motif-containing viral suppressor of RNA silencing. *J Biol Chem*;290(5):3106–3120.
- Pontes, O., Li, C.F., Costa Nunes, P., Haag, J., Ream, T., Vitins, A., Jacobsen, S.E., and Pikaard, C.S. 2006. The Arabidopsis chromatin-modifying nuclear siRNA pathway involves a nucleolar RNA processing center. *Cell* 126, 79-92.
- Prigge, M.J., and Wagner, D.R. 2001. The Arabidopsis SERRATE Gene Encodes a Zinc-Finger Protein Required for Normal Shoot Development. *The Plant Cell* 13, 1263-1280.
- PROMALS: towards accurate multiple sequence alignments of distantly related proteins. Jimin Pei and Nick V. Grishin. *Bioinformatics* 2007.
- Pujol, A. R. & Beñatena, H. N. 1965. Study of psorosis in Concordia, Argentina. In *Proc of the 3rd Conf of IOCV*, pp. 170-174. Edited by W. C. Price. Gainesville, Florida, USA: University Florida Press.
- Qi, Y., Denli, A.M., and Hannon, G.J. 2005. Biochemical specialization within Arabidopsis RNA silencing pathways. *Mol Cell* 19, 421-428.
- Qin, H., Chen, F., Huan, X., Machida, S., Song, J., and Yuan, Y.A. 2010. Structure of the Arabidopsis thaliana DCL4 DUF283 domain reveals a noncanonical double-stranded RNA-binding fold for protein–protein interaction. *Rna* 16, 474-481.
- Qu, F., Ren, T., Morris, T.J., 2003. The coat protein of turnipcrinkle virus suppresses post transcriptional gene silencing at an early initiation step. *J. Virol.* 77, 511–522.
- Qu F, Ye X, Morris TJ., 2008. Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7 and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:14732–14737
- Raczynska, K. D., 2014. The SERRATE protein is involved in alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* 42, 1224–1244.
- Raghuram, B., Sheikh, A.H., Rustagi, Y., and Sinha, A.K. 2015. MicroRNA biogenesis factor DRB1 is a phosphorylation target of mitogen activated protein kinase MPK3 in both rice and Arabidopsis. *FEBS J.* 282, 521–536.
- Rajagopalan R, Vaucheret H, Trejo J, Bartel DP. 2006. A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* 20: 3407–3425.

- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B., and Bartel, D.P. 2002. MicroRNAs in plants. *Genes Dev* 16, 1616-1626.
- Reis, R.S. 2015. Gene regulation by translational inhibition is determined by Dicer partnering proteins. *Nat. Plants* 1, 14027
- Reyes, C.A., Pena, E.J., Zaneck, M.C., Sanchez, D.V., Grau, O. and Garcia, M.L. 2009. Differential resistance to Citrus psorosis virus in transgenic *Nicotiana benthamiana* plants expressing hairpin RNA derived from the coat protein and 54K protein genes. *Plant Cell Rep.* 28, 1817-1825.
- Reyes CA, Ocolotobiche EE, Marmisolle FE, Robles Luna G, García M.L., 2016. Citrus psorosis virus 24 K protein interacts with citrus miRNA precursors, affects their processing and subsequent miRNA accumulation and target expression. *Mol Plant Pathol* 17(3):317-329.
- Robles Luna G, Peña EJ, Borniego MB, Heinlein M, Garcia ML., 2013. Ophioviruses CPsV and MiLBVV movement protein is encoded in RNA 2 and interacts with the coat protein. *Virology* 441(2):152-161.
- Robles Luna, G., 2014. Estudio de la función de las proteínas de Citrus psorosis virus y Mirafiori lettuce big-vein virus, Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.
- Robles Luna G, Reyes CA, Peña EJ, Ocolotobiche E, Borniego MB, García ML., 2017. Identification and characterization of two RNA silencing suppressors encoded by ophioviruses. *Virus Res* 235:96-105.
- Robles Luna G, Peña EJ, Borniego MB, Heinlein M, García ML. 2018. Citrus psorosis virus movement protein contains an aspartic protease required for autocleavage and the formation of tubule-like structures at plasmodesmata. *J Virol* 92(21):1-18.
- Rogers, K., and Chen, X. 2013. Biogenesis, Turnover, and Mode of Action of Plant MicroRNAs. *Plant Cell*.
- Roistacher CN., 1991. Graft-transmissible diseases of citrus: Handbook for detection and diagnosis. Rome: International Organization of Citrus Virologists. Food and Agriculture Organization of the United Nations
- Roistacher CN., 1993. Psorosis a review. 12th Conf International Organisation of Citrus Virologists. IOCV, Riverside, pp139-162
- Ruiz-Ruiz, S., Navarro, B., Gisell, A., Pena, L., Navarro, L., Moreno, P., Di Serio, F. and Flores, R. 2011. Citrus tristeza virus infection induces the accumulation of viral small RNAs (21-24-nt) mapping preferentially at the 3'-terminal region of the genomic RNA and affects the host small RNA profile. *Plant Mol. Biol.* 75, 607-619.
- Sabbione, A., Daurelio, L., Vegetti, A., Talón, M., Tadeo, F., & Dotto, M. 2019. Genome-wide analysis of AGO, DCL and RDR gene families reveals RNA-directed DNA methylation is involved in fruit abscission in *Citrus sinensis*. 1-13.
- Sanchez de la Torre, M.E., Lopez, C., Grau, O., Garcia, M.L., 2002. RNA 2 of Citrus psorosis virus is of negative polarity and has a single open reading frame in its complementary strand. *J. Gen. Virol.* 83, 1777-1781.
- Schwab, R., Palatnik, J. F., Riester, M., Schommer, C., Schmid, M. & Weigel, D. 2005. Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Dev Cell* 8, 517-527.
- Schwab, R., Speth, C., Laubinger, S., and Voinnet, O. 2013. Enhanced microRNA accumulation through stemloop-adjacent introns. *EMBO reports* 14, 615-621.
- Scott, M.S., Boisvert, F.M., McDowall, M.D., Lamond, A.I., Barton, G.J., 2010. Characterization and prediction of protein nucleolar localization sequences. *Nucleic Acids Res* 38, 7388-7399.
- Scott, M.S., Troshin, P.V., Barton, G.J., 2011. NoD: a Nucleolar localization sequence detector for eukaryotic and viral proteins. *BMC Bioinformatics* 12, 317.
- Shen, H.B., Chou, K.C., 2007. Virus-PLoc: a fusion classifier for predicting the subcellular localization of viral proteins within host and virus-infected cells. *Biopolymers* 85, 233-240.
- Shen WX, Au PCK, Shi BJ, Smith NA, Dennis ES, Guo HS, Zhou CY, Wang MB. 2015. Satellite RNAs interfere with the function of viral RNA silencing suppressors. *Front Plant Sci*;6:281
- Singh, K., Talla, A. and Qiu, W. 2012. Small RNA profiling of virus-infected grapevines: evidence for virus infection-associated and variety-specific miRNAs. *Funct. Integr. Genomics*, 12, 659-669.
- Song C, Jia Q, Fang J, Li F, Wang C, Zhang Z., 2010a. Computational identification of citrus microRNAs and target analysis in citrus expressed sequence tags. *Plant Biol* 12:927-934.
- Song C, Wang C, Zhang C, Korir NK., 2010b. Deep sequencing discovery of novel and conserved microRNAs in trifoliolate orange (*Citrus trifoliata*). *BMC Genomics* 11:431.
- Song, L., Axtell, M.J., and Fedoroff, N.V. 2010. RNA secondary structural determinants of miRNA precursor processing in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 20, 37-41.
- Sorenson R, Bailey-Serres J. 2015. Rapid immunopurification of ribonucleoprotein complexes of plants. *Methods Mol Biol*;1284:209-19.

- Stanley, W.M., 1935. Isolation of a Crystalline Protein Possessing the Properties of Tobacco-Mosaic Virus. *Science* 81, 644-645.
- Stepien, A., Knop, K., Dolata, J., Taube, M., Bajczyk, M., Barciszewska-Pacak, M., Pacak, A., Jarmolowski, A. and Szweykowska-Kulinska, Z., 2017. Posttranscriptional coordination of splicing and miRNA biogenesis in plants. *Wiley Interdiscipl. Rev. RNA*, 8.
- Sun, Z., Guo, T., Liu, Y., Liu, Q. and Fang, Y., 2015. The Roles of Arabidopsis CDF2 in transcriptional and posttranscriptional regulation of primary microRNAs. *PLoS Genet.* 11, e1005598.
- Swingle, W.T. and Webber H.J. 1896. The principal diseases of citrus fruits in Florida. USDA Div. Veg. Physiol. Pathol. Bull. 8.
- Szarynska, B., Sobkowiak, L., Pant, B.D., Balazadeh, S., Scheible, W.R., Mueller-Roeber, B., Jarmolowski, A. and Szweykowska-Kulinska, Z. 2009. Gene structures and processing of Arabidopsis thaliana HYL1-dependent pri-miRNAs. *Nucleic Acids Res.*, 37, 3083-3093.
- Szittyá G and Burgýan J. 2013. RNA interference-mediated intrinsic antiviral immunity in plants. *Curr Top Microbiol Immunol.* 371:153-181.
- Taliansky, M.E., Brown, J.W., Rajamaki, M.L., Valkonen, J.P., Kalinina, N.O., 2010. Involvement of the plant nucleolus in virus and viroid infections: parallels with animal pathosystems. *Adv Virus Res* 77, 119-158.
- Taly, J.F., Magis, C., Bussotti, G., Chang, J.M., Di Tommaso, P., Erb, I., Espinosa-Carrasco, J., Kemena, C., Notredame, C., 2011. Using the T-Coffee package to build multiple sequence alignments of protein, RNA, DNA sequences and 3D structures. *Nat. Protoc.* 6, 1669-1682.
- Taylor, R. S., Tarver, J. E., Foroozani, A., & Donoghue, P. C. J. 2017. MicroRNA annotation of plant genomes – Do it right or not at all. *BioEssays*, 39(2), 1-6.
- Terzi LC, Simpson GG. 2009. Arabidopsis RNA immunoprecipitation. *Plant J.*; 59:163-8.
- Till, S., Lejeune, E., Thermann, R., Bortfeld, M., Hothorn, M., Enderle, D., Heinrich, C., Hentze, M.W., Ladurner, A.G., 2007. A conserved motif in Argonaute-interacting proteins mediates functional interactions through the Argonaute PIWI domain. *Nat Struct Mol Biol* 14, 897-903.
- Timmer, L. W., Garnsey, S. M. & McRitchie, J. J. 1978. Comparative symptomatology of Florida and Texas isolates of citrus ringspot virus on citrus and herbaceous hosts. *Plant Disease Reporter* 62, 1054-1058.
- Tong A, Yuan Q, Wang S, Peng J., 2017. Altered accumulation of osa-miR171b contributes to rice stripe virus infection by regulating disease symptoms. *J Exp Bot* 68:4357-4367.
- Vargason, J. M., Burch, C. J. & Wilson, J. W. 2013. Identification and RNA binding characterization of plant virus RNA silencing suppressor proteins. *Methods* 64, 88-93.
- Vaucheret H., Mallory A. C., Bartel D. P. 2006. AGO1 homeostasis entails coexpression of MIR168 and AGO1 and preferential stabilization of miR168 by AGO1. *Mol. Cell.* 22, 129-136.
- Vaucheret, H. 2008. Plant ARGONAUTES. *Trends in Plant Science* 13, 350-358.
- Vaucheret H., 2009. Ago1 homeostasis involves differential production of 21-nt and 22-nt mir168 species by mir168a and mir168b. *PLoS One*;4(7):e6442.
- Vazquez, F., Gascioli, V., Crete, P., and Vaucheret, H. 2004a. The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing. *Curr Biol* 14, 346-351.
- Vinutha, T. 2018. Tomato geminivirus encoded RNAi suppressor protein, AC4 interacts with host AGO4 and precludes viral DNA methylation. *Gene* 678, 184-195
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., Baulcombe, D., 2003. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 33, 949-956.
- Voinnet, O. 2009. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* 136, 669-687.
- Wallace, J.M. 1957. Virus-strain interference in relation to symptoms of psorosis disease of citrus. *Hilgardia* 27, 223-246.
- Wang, L., Brown, S.J., 2006. BindN: a web-based tool for efficient prediction of DNA and RNA binding sites in amino acid sequences. *Nucleic Acids Res* 34, W243-248.
- Wang, L., Song, X., Gu, L., Li, X., Cao, S., Chu, C., Cui, X., Chen, X., and Cao, X. 2013. NOT2 proteins promote polymerase II-dependent transcription and interact with multiple MicroRNA biogenesis factors in Arabidopsis. *Plant Cell* 25, 715-727.
- Wang, Z., Ma, Z., Castillo-Gonzalez, C., Sun, D., Li, Y., Yu, B., Zhao, B., Li, P. and Zhang, X. 2018. SWI2/SNF2 ATPase CHR2 remodels pri-miRNAs via Serrate to impede miRNA production. *Nature*, 557, 516-521.
- Wang, Y., 2019. Geminiviral V2 protein suppresses transcriptional gene silencing through interaction with AGO4. *J. Virol.* 93, JVI-0167535.
- Warpeha KM, Upadhyay S, Yeh J, Adamiak J., 2007. The GCR1, GPA1, PRN1, NF-Y signal

- chain mediates both blue light and abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 143:1590–1600.
- Wei, K., Wu, L., Chen, J., Chen, Y., and Xie, D. 2012a. Structural evolution and functional diversification analyses of argonaute protein. *Journal of Cellular Biochemistry* 113, 2576–2585.
- Werner, S., Wollmann, H., Schneeberger, K., and Weigel, D. 2010. Structure determinants for accurate processing of miR172a in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* 20, 42–48.
- Wiederstein, M., Sippl, M.J., 2007. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res* 35, W407–410.
- Willmann, M.R., and Poethig, R.S. 2011. The effect of the floral repressor FLC on the timing and progression of vegetative phase change in *Arabidopsis*. *Development* 138, 677–685.
- Wu, F., Yu, L., Cao, W., Mao, Y., Liu, Z., and He, Y. 2007. The N-terminal double-stranded RNA binding domains of *Arabidopsis* HYPONASTIC LEAVES1 are sufficient for pre-microRNA processing. *Plant Cell* 19, 914–925.
- Wu XM, Liu MY, Xu Q, Guo WW., 2010. Identification and characterization of microRNAs from citrus expressed sequence tags. *Tree Gen Genome* 7:117–133.
- Xie, Z., Allen, E., Fahlgren, N., Calamar, A., Givan, S.A., and Carrington, J.C. 2005. Expression of *Arabidopsis* MIRNA genes. *Plant Physiol* 138, 2145–2154.
- Xu, Q., Liu, Y., Zhu, A., Wu, X., Ye, J., Yu, K., Guo, W. and Deng, X. 2010. Discovery and comparative profiling of microRNAs in a sweet orange red-flesh mutant and its wild type. *BMC Genomics*, 11, 246.
- Xu, Q. 2012. 'The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*).', *Nature genetics*. Nature Publishing Group, 45(1), pp. 59–66.
- Xu Q, Chen LL, Ruan X, Chen D., 2013. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nat Genet* 45:59–66.
- Xu D, Mou G, Wang K, Zhou G., 2014. microRNAs responding to southern rice black-streaked dwarf virus infection and their target genes associated with symptom development in rice. *Virus Res* 190:60–68.
- Xu, D., Marquis, K., Pei, J., Fu, S.C., Cagatay, T., Grishin, N.V., Chook, Y.M., 2015. LocNES: a computational tool for locating classical NESs in CRM1 cargo proteins. *Bioinformatics* 31, 1357–1365.
- Xue T, Wang D, Zhang S, Ehrling J, Ni F, Jakab S, Zheng C, Zhong Y. 2008. Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and *Arabidopsis*. *BMC Genomics* 9: 550.
- Yan, J., Wang, P., Wang, B., Hsu, C.C., Tang, K., Zhang, H., Hou, Y.J., Zhao, Y., Wang, Q., Zhao, C., 2017. The SnRK2 kinases modulate miRNA accumulation in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* 13, e1006753.
- Yang, L., Liu, Z., Lu, F., Dong, A., and Huang, H. 2006. SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in *Arabidopsis*. *Plant J* 47, 841–850.
- Yang, S.W., Chen, H.Y., Yang, J., Machida, S., Chua, N.H., and Yuan, Y.A. 2010. Structure of *Arabidopsis* HYPONASTIC LEAVES1 and its molecular implications for miRNA processing. *Structure* 18, 594–605.
- Yang, X., Ren, W., Zhao, Q., Zhang, P., Wu, F., and He, Y. 2014. Homodimerization of HYL1 ensures the correct selection of cleavage sites in primary miRNA. *Nucleic Acids Res.* 42, 12224–12236.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y., 2015. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods* 12, 7–8.
- Yang, Z. and Li, Y. 2018. Dissection of RNAi-based antiviral immunity in plants. *Curr. Opin. Virol.* 32, 88–99 23.
- Yin, X., Wang, J., Cheng, H., Wang, X. and Yu, D. 2013. Detection and evolutionary analysis of soybean miRNAs responsive to soybean mosaic virus. *Planta*, 237, 1213– 1225
- Yin Z, Murawska Z, Xie F, Pawelkowicz M, Michalak K, Zhang B, Lebecka R., 2018. microRNA response in potato virus Y infected tobacco shows strain-specificity depending on host and symptom severity, *Virus Research*
- Yoshikawa M, Peragine A, Park MY, Poethig RS., 2005. A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 19:2164–2175.
- Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R.W., Steward, R., and Chen, X. 2005. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science* 307, 932–935.
- Yu X, Willmann MR, Anderson SJ, Gregory BD., 2016. Genome wide mapping of uncapped and cleaved transcripts reveals a role for the nuclear mRNA 5' cap-binding complex in co-translational RNA decay in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 28:2385–2397.
- Zhang, H., Kolb, F.A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., and Filipowicz, W. 2004. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 118, 57–68.
- Zhang, X., Zhao, H., Gao, S., Wang, W.C., Katiyar-Agarwal, S., Huang, H.D., Raikhel, N., and Jin, H. 2011. *Arabidopsis* Argonaute 2

- regulates innate immunity via miRNA393(*)-mediated silencing of a Golgi-localized SNARE gene, MEMB12. *Mol Cell* 42, 356-366.
- Zhang JZ, Ai XY, Guo WW, Peng SA., 2012. Identification of miRNAs and their target genes using deep sequencing and degradome analysis in trifoliate orange [*Poncirus trifoliata* L. Raf]. *Mol Biotechnol* 51:44–57
- Zhang, X., Lii, Y., Wu, Z., Polishko, A., Zhang, H., Chinnusamy, V., Lonardi, S., Zhu, J.-K., Liu, R., and Jin, H. 2013. Mechanisms of Small RNA Generation from Cis-NATs in Response to Environmental and Developmental Cues. *Molecular Plant* 6, 704-715.
- Zhang, S., Liu, Y., & Yu, B. 2015. New insights into pri-miRNA processing and accumulation in plants. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 6(5), 533–545.
- Zhang, B., Li, W., Zhang, J., Wang, L., & Wu, J. 2019. Roles of Small RNAs in Virus-Plant Interactions. *Viruses*, 11(9).
- Zhao, Y., and Srivastava, D. 2007. A developmental view of microRNA function. *Trends in Biochemical Sciences* 32, 189-197.
- Zheng L, Zhang C, Shi C, Yang Z, Wang Y, Zhou T, 2017. Rice stripe virus NS3 protein regulates primary miRNA processing through association with the miRNA biogenesis factor OsDRB1 and facilitates virus infection in rice. *PLoS Pathog* 13(10): e1006662.
- Zhu, H., Hu, F., Wang, R., Zhou, X., Sze, S.H., Liou, L.W., Barefoot, A., Dickman, M., and Zhang, X. 2011. Arabidopsis Argonaute10 specifically sequesters miR166/165 to regulate shoot apical meristem development. *Cell* 145, 242-256.
- Zhu QH, Helliwell CA., 2011. Regulation of flowering time and floral patterning by miR172. *J Exp Bot* 62:487–495
- Zhu, H., Zhou, Y., Castillo-Gonzalez, C., Lu, A., Ge, C., Zhao, Y.T., Duan, L., Li, Z., Axtell, M.J., Wang, X.J., 2013. Bidirectional processing of pri-miRNAs with branched terminal loops by Arabidopsis Dicer-like1. *Nat Struct Mol Biol* 20, 1106-1115.
- Zielezinski, A., Karlowski, W.M., 2011. Agos—a universal web tool for GW Argonaute-binding domain prediction. *Bioinformatics* 27, 1318-1319.
- Zuker, M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31, 3406-3415.

ANEXOS



Citrus psorosis virus 24K protein interacts with citrus miRNA precursors, affects their processing and subsequent miRNA accumulation and target expression

CARINA A. REYES^{1,*}, ELIANA E. OCOLOTOBICHE¹, FACUNDO E. MARMISOLLÉ¹, GABRIEL ROBLES LUNA¹, MARÍA B. BORNIEGO¹, ARIEL A. BAZZINI^{2,†}, SEBASTIAN ASURMENDI² AND MARÍA L. GARCÍA¹

¹Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, CCT-La Plata, CONICET—UNLP, Calles 47 y 115, 1900 La Plata, Buenos Aires, Argentina

²Instituto de Biotecnología, CICVyA-INTA, Hurlingham, Buenos Aires, Argentina

SUMMARY

Sweet orange (*Citrus sinensis*), one of the most important fruit crops worldwide, may suffer from disease symptoms induced by virus infections, thus resulting in dramatic economic losses. Here, we show that the infection of sweet orange plants with two isolates of *Citrus psorosis virus* (CPsV) expressing different symptomatology alters the accumulation of a set of endogenous microRNAs (miRNAs). Within these miRNAs, miR156, miR167 and miR171 were the most down-regulated, with almost a three-fold reduction in infected samples. This down-regulation led to a concomitant up-regulation of some of their targets, such as *Squamosa promoter-binding protein-like 9* and *13*, as well as *Scarecrow-like 6*. The processing of miRNA precursors, pre-miR156 and pre-miR171, in sweet orange seems to be affected by the virus. For instance, virus infection increases the level of unprocessed precursors, which is accompanied by a concomitant decrease in mature species accumulation. miR156a primary transcript accumulation remained unaltered, thus strongly suggesting a processing deregulation for this transcript. The co-immunoprecipitation of viral 24K protein with pre-miR156a or pre-miR171a suggests that the alteration in the processing of these precursors might be caused by a direct or indirect interaction with this particular viral protein. This result is also consistent with the nuclear localization of both miRNA precursors and the CPsV 24K protein. This study contributes to the understanding of the manner in which a virus can alter host regulatory mechanisms, particularly miRNA biogenesis and target expression.

Keywords: *Citrus psorosis virus*, microRNA processing, *Ophiovirus*, sweet orange.

INTRODUCTION

MicroRNAs (miRNAs) are small RNA molecules that regulate gene expression in plants and animals (Bartel, 2004; Jones-Rhoades *et al.*, 2006). Plant primary miRNAs (pri-miRNAs) are synthesized by RNA pol II and have a characteristic 5' cap and 3' poly-A tail (Lee *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2005). These pri-miRNA transcripts form hairpin-like structures and are sequentially processed by RNase III-like proteins, namely DICER-like 1 (DCL1) in *Arabidopsis thaliana*, to generate miRNA precursors (pre-miRNAs) and, ultimately, miRNA/miRNA* duplexes (Kurihara and Watanabe, 2004; Park *et al.*, 2002). miRNA processing occurs in the specialized D-bodies located in plant nuclei (Fang and Spector, 2007; Fujioka *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2007); DCL1 interacts with the double-stranded RNA (dsRNA)-binding protein HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1) (Han *et al.*, 2004; Vazquez *et al.*, 2004). In addition, SERRATE and components of the cap-binding complex, which are required for splicing, also contribute to miRNA biogenesis (Gregory *et al.*, 2008; Lobb *et al.*, 2006).

A systematic analysis of the mechanism of plant miRNA precursor processing revealed two main models: one progressing base to loop and the other loop to base. The first model implies the recognition of a lower stem (~15 nucleotide) to position for the initial DCL1 cleavage event (Mateos *et al.*, 2010). In the second model, the first cut would progress next to the main loop (Bologna *et al.*, 2009, 2013a, b). Subsequently, the mature duplex miRNA is exported to the cytoplasm by HASTY (Park *et al.*, 2005) and one of the strands is integrated into the RNA-induced silencing complex (RISC), which guides this complex to the complementary mRNA targets. RISC eventually inhibits translation elongation (Brodersen *et al.*, 2008) or triggers the degradation of target mRNA (Llave *et al.*, 2002).

Several miRNA families are fundamental gene regulatory players in the fine tuning of correct plant development (Schwab *et al.*, 2005). In addition, miRNAs also have important functions in the response to biotic stress. For example, *A. thaliana* miR393 is induced by *flg22* (a 22-amino-acid sequence of the conserved N-terminal part of flagellin), thus playing an important role in

*Correspondence: Email: carinar@biol.unlp.edu.ar

†Present address: Department of Genetics, Yale University School of Medicine, New Haven, CT 06510, USA.

plant antibacterial resistance (Navarro *et al.*, 2006). Both plant and animal viruses can interfere with miRNA-mediated regulation in the host through different mechanisms exerted at transcriptional or post-transcriptional levels (Cazalla *et al.*, 2010; Chapman *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2004; Kasschau *et al.*, 2003; Pfeffer and Voinnet, 2006; Silhavy and Burgyn, 2004). The latter option involves miRNA processing alteration, accumulation and activity.

Originally, most studies have focused on post-transcriptional mechanisms in which increased miRNA levels are associated with the presence of viral suppressors of RNA silencing (VSRs) (Chapman *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2004; Dunoyer *et al.*, 2004; Lakatos *et al.*, 2006; Silhavy and Burgyn, 2004). However, other reports have shown that a virus infection and/or the transgenic expression of viral proteins with weak VSR activity can also interfere with miRNA pathways (Bazzini *et al.*, 2007; Tagami *et al.*, 2007). Indeed, infections by *Tobacco mosaic virus* (TMV) and *Oilseed rape mosaic virus* (ORMV) are clear examples of miRNA alterations at the transcriptional level (Bazzini *et al.*, 2009). In addition, the level of conserved miRNAs is reduced after virus infection in tomato, soybean, grapevine and citrus through an alternative molecular mechanism of miRNA interference that cannot be explained by VSR activity (Amin *et al.*, 2011; Naqvi *et al.*, 2010; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2013). There are a few examples of viruses interfering with pre-miRNA nuclear export and processing by DICER, as is the case for adenoviruses (Lu and Cullen, 2004). By contrast, to date, there have been no reports of plant viruses interfering with miRNA processing.

Sweet orange (*Citrus sinensis*) is one of the most important fruit crops worldwide. Despite the important roles of miRNAs in plant development, their expression profile and function in non-model plants have been poorly studied and there are few reports on miRNAs in fruit crops (Moxon *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2010a, b; Wang *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2010, 2013; Zhu *et al.*, 2012). The sequence and pattern of about 40 conserved and 10 novel miRNAs were first described in *Citrus reticulata*, *Poncirus trifoliata*, *Citrus dementina* and *Citrus sinensis* using deep sequencing (Song *et al.*, 2010a, b). Recently, 227 known miRNAs have been identified in *C. sinensis* (Xu *et al.*, 2010, 2013).

Citrus psorosis is a severe viral disease affecting most citrus species. This disease was epidemic in the 1980s and is still present in Argentina and Uruguay (Anderson, 2000; Zaneck *et al.*, 2006). In the field, symptoms include bark scaling of the trunk on sweet orange, mandarin and grapefruit, as well as chlorotic flecks and spots on young leaves, and a shock reaction expressed as the necrosis of young shoots. The causal agent of the disease is *Citrus psorosis virus* (CPsV), the type member of the genus *Ophiovirus*, family *Ophioviridae* (Garcia *et al.*, 1994; Milne *et al.*, 2003). CPsV is a tripartite virus with a genome of three single-stranded RNAs (ssRNAs) of negative polarity. RNA 1

codes for the 24K protein and, separated by an intergenic region, the RNA-dependent RNA polymerase (Naum-Ongania *et al.*, 2003). RNA 2 harbours the movement protein (54K protein) (Robles Luna *et al.*, 2013), whereas RNA 3 codes for the coat protein (Sánchez de la Torre *et al.*, 1998). To date, no study has characterized the viral suppressor activity of ophioviruses, and therefore the ability of CPsV to modify miRNA pathways remains completely unknown.

In the present study, we analysed the accumulation of several conserved mature miRNAs, miRNA processing products and their targets in citrus plants infected with two distantly related CPsV isolates that induce symptoms of different severity. We determined that the processing of miR156 and miR171 precursors is affected by CPsV infection in *C. sinensis* plants. The co-immunoprecipitation of 24K viral protein with miRNA precursors in *Nicotiana benthamiana* plants suggests that CPsV directly or indirectly interferes with this mechanism and, consequently, with miRNA and miRNA target accumulation.

RESULTS

Misregulation of conserved citrus miRNAs by CPsV infection

Plant viruses can alter host miRNA and miRNA target expression, including genes involved in plant development and stress responses. To analyse whether CPsV infection modifies miRNA accumulation in citrus and whether there is any association with different symptoms, we infected sweet orange seedlings with the Argentine isolate CPsV 90-1-1 or the distantly related isolate CPV4 from Texas, USA (85% nucleotide identity; Martin *et al.*, 2006). The foliar symptoms of CPsV 90-1-1 observed in experimentally graft-inoculated plants include chlorotic flecks and spots on young leaves, as well as wilting and necrosis in young shoots, resulting in a progressive shock reaction (Fig. 1A–C, F). CPV4 shares foliar symptoms with CPsV 90-1-1, but does not produce the shock reaction. Bazzini *et al.* (2007) have previously tested a group of conserved miRNAs, and demonstrated a correlation between symptom severity and alteration in miRNA levels in infected *Nicotiana tabacum* plants. In the present study, 10 conserved miRNAs, including some of those studied by Bazzini *et al.* (2007), were selected and analysed by Northern blot using probes against *Citrus trifoliata* or *Citrus sinensis* miRNA sequences available in miRBase (Table S1, see Supporting Information).

Samples were collected from plants infected with each isolate expressing each characteristic symptom (shock or flecking; Fig. 1A, D, respectively). Virus levels in the different samples were similar (Table S2, see Supporting Information). In parallel, samples were collected from healthy plants with the same shoot size, age and at the same developmental state (Fig. 1E). For the

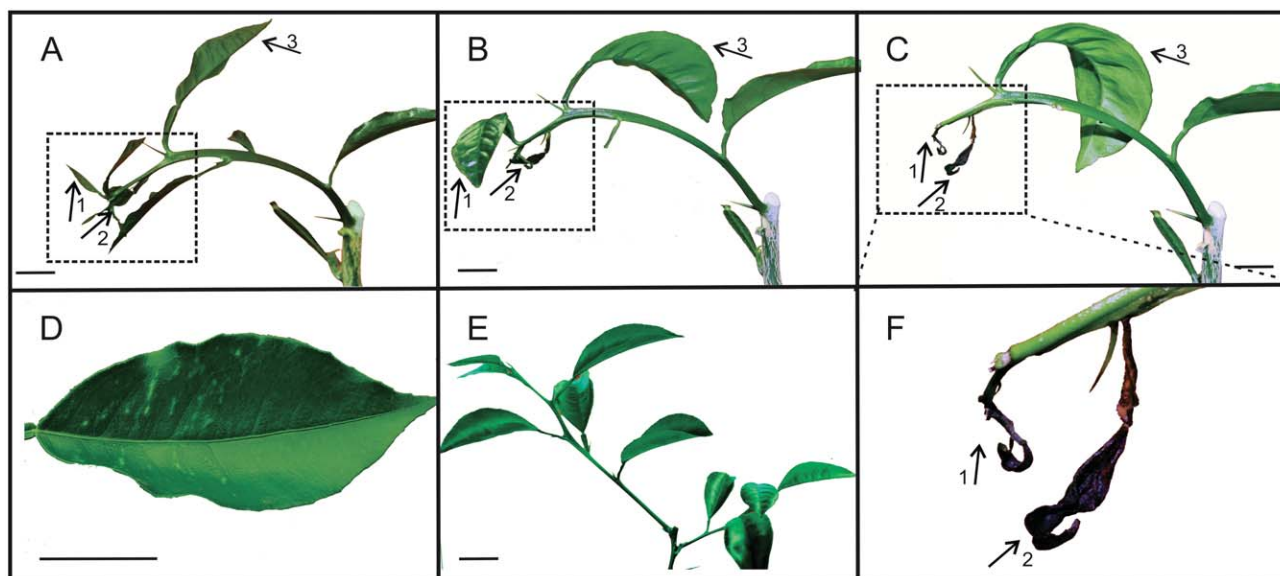


Fig. 1 Symptoms observed in *Citrus sinensis* plants infected with *Citrus psorosis virus* (CPsV) isolates used for microRNA (miRNA) and target analyses. (A–C, F) Young shoot displaying a progressive shock reaction caused by CPsV-90-1-1, including epinasty and, finally, necrosis of the leaves. Leaves 1 and 2 show progressive necrosis (time between A and C, 15 days). (D) Flecking symptoms caused by CPsV 90-1-1 isolate in leaves of plants of the same developmental stage. (Leaves from the CPV4-infected plants show similar flecking symptoms.) (E) healthy shoots. (F) Shock reaction in detail (inset). Scale bars: 5 mm equals 10 mm.

case of the shock reaction, samples were collected when young flushes began to bend and just before the onset of necrosis (Fig. 1A).

Most analysed miRNAs (seven of ten; miR156, miR167, miR169, miR171, miR172, miR393 and miR403) showed a decreased accumulation in infected relative to non-infected tissues (Fig. 2A, B). The mature miRNA level ranged from a 1.2- to 2.8-fold reduction compared with the healthy sample. miR156 and miR171 were the most drastically altered miRNAs. In particular, miR156 showed a reduction in the accumulation of the mature miRNA species present in flecking samples, from 1.5- to two-fold compared with the healthy control (in both isolates), whereas tissue displaying shock showed a more severe decrease of 2.8-fold (Fig. 2B). Differences between shock and flecking samples were significant for miR156. miR171 showed similar decreasing levels and association pattern, but differences between shock and flecking samples were not significant. miR167 also displayed a drastic down-regulation on virus infection with similar levels for all infected samples (around two-fold). miR169 showed a detectably reduced level in flecking samples, but no significant differences for the shock sample. Finally, miR172, miR393 and miR403 showed lower levels of down-regulation in some of the infected samples. In particular, miR172 showed a faint band in Northern blots, but the results from three independent experiments exhibited similar accumulation patterns (Fig. 2B).

In summary, we found that the infection of citrus plants with two CPsV isolates caused a reduction in the accumulation level of

several miRNAs, and that miR156, miR171 and miR167 were the most highly down-regulated miRNAs.

Induction of miRNA target expression in CPsV-infected *C. sinensis* plants

To assess whether mRNA target levels of the most strongly down-regulated miRNAs were also affected after CPsV infection, we selected the following genes to provide further analysis: *Squamosa promoter-binding protein-like (SPL) 9 and 13*, *Scarecrow-like 6 (SCL6)* and *Auxin response factor (ARF) 6 and 8*. *SPL9* and *SPL13* (miR156 targets) are involved in the juvenile to adult phase transition, abiotic stress responses, symptom expression and defence (Cardon *et al.*, 1997, 1999; Cui *et al.*, 2014; Klein *et al.*, 1996; Padmanabhan *et al.*, 2013), whereas *SCL6* (miR171 target) is involved in gibberellic acid responses that control flowering and regulate apical meristem development (Bolle, 2004) and chlorophyll biosynthesis (Ma *et al.*, 2014). Finally, *ARF6* and *ARF8* (miR167 targets) regulate flower development caused by VSR expression in *A. thaliana* plants (Jay *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2006). These transcripts are targets in *A. thaliana* as well as in citrus (Song *et al.*, 2010a).

RNA extracts obtained from the same foliar samples as used for miRNA quantification were subjected to quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) (Fig. 3). *SPL9* showed an up-regulation of approximately two-fold, compared with the healthy control, in CPsV 90-1-1-infected leaves expressing flecking symptoms. Samples from plants infected with the

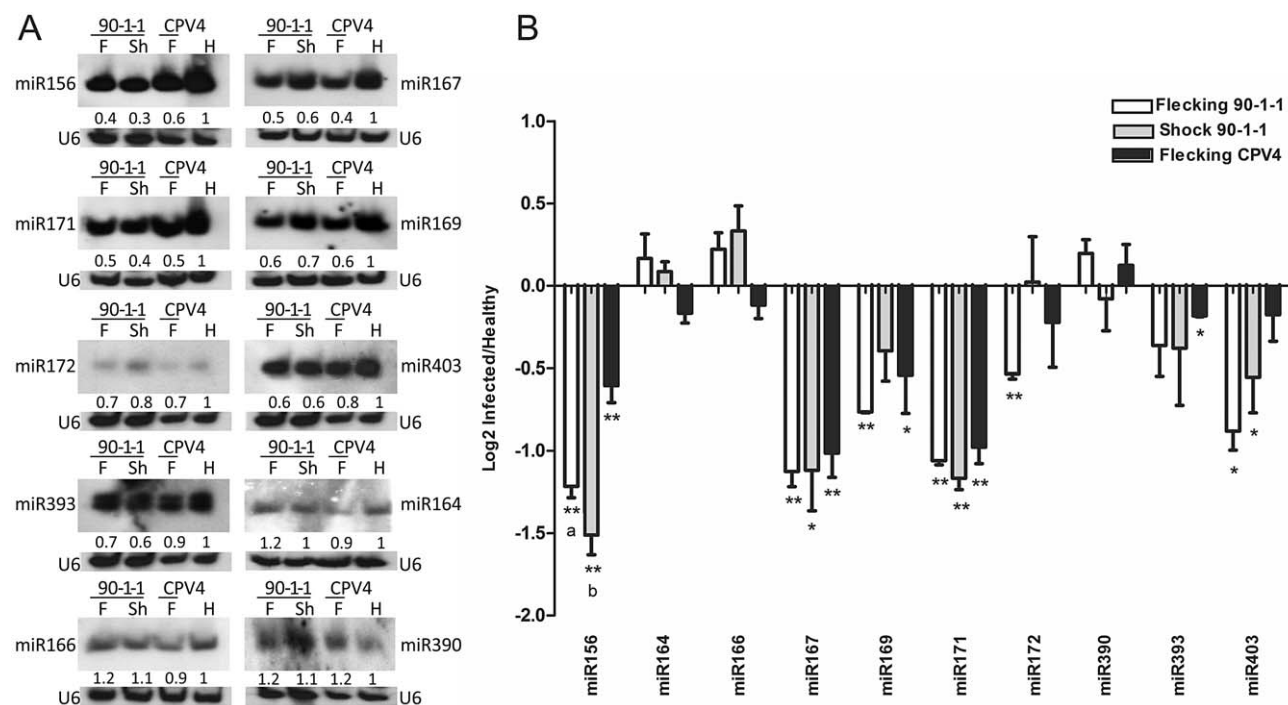


Fig. 2 Accumulation of endogenous microRNAs (miRNAs) in *Citrus sinensis* plants infected with *Citrus psorosis virus* (CPsV) 90-1-1 or CPV4 isolate. (A) Representative Northern blot analysis of various conserved miRNAs after infection. F, flecking symptom; H, healthy leaves; Sh, shock reaction symptom. Lower panels show U6 normalization. Ratios between band densities of each miRNA and U6 were calculated. (B) Relative accumulation of miRNA compared with healthy leaves ($H = 1$) (mean values and standard error of miRNA level of three independent experiments). The graphs were plotted as \log_2 of the infected/healthy sample ratios. Differences between two groups were tested with a two-tailed paired *t*-test. * and ** indicate $P < 0.05$ and $P < 0.01$ values, respectively, in comparison with the healthy group. a and b indicate $P < 0.05$ between F and Sh, respectively.

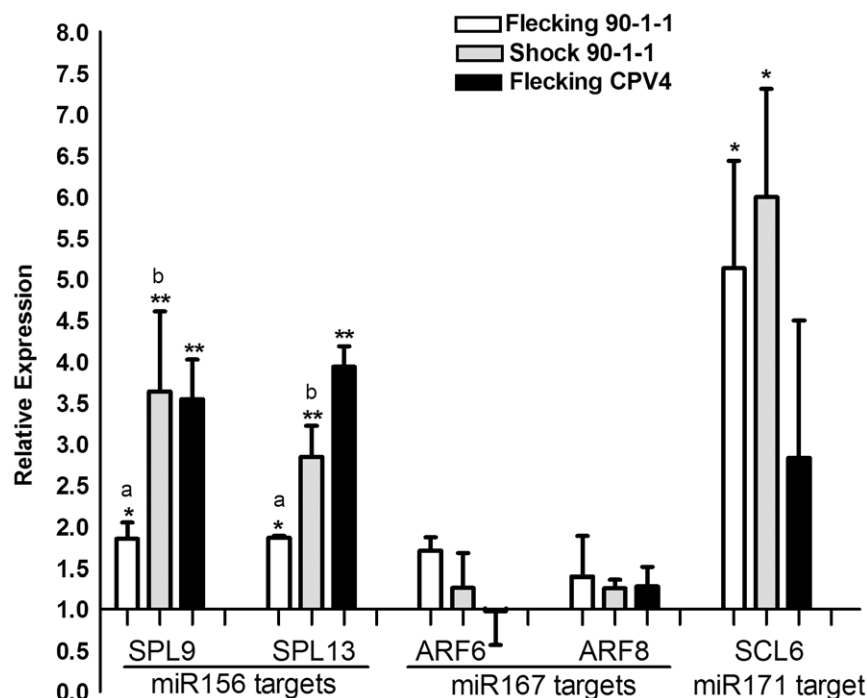


Fig. 3 Accumulation of microRNA (miRNA) target transcripts in *Citrus sinensis* plants infected with *Citrus psorosis virus* (CPsV) 90-1-1 or CPV4 isolate. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) assays were performed to determine the expression levels of *Squamosa promoter-binding protein-like 9* (SPL9) and *SPL13* (miR156 targets), *Auxin response factor 6* (ARF6) and *ARF8* (miR167 targets) and *Scarecrow-like 6* (SCL6) (miR171 target). Mean values and standard errors of three independent experiments are shown. Healthy samples are established as 1. Differences from the healthy samples were tested using a two-tailed paired *t*-test. * and ** indicate $P < 0.05$ and $P < 0.01$ values, respectively. a and b indicate $P < 0.05$ value between F and Sh, respectively.

same isolate, but expressing shock reaction, accumulated about 3.5-fold higher levels of miRNAs. Similar increases resulted in the accumulation of *SPL9* transcripts from CPV4-infected leaves expressing flecking symptoms. The behaviour of *SPL13* was comparable, but CPV4 samples showed a more striking up-regulation of about four-fold. *ARF6* and *ARF8* did not show significant changes in any sample; these genes may be regulated at a translational level or in specific tissues. *SCL6* levels were more than five times higher in the CPsV 90-1-1-infected samples (flecking and shock). The average levels of the *SCL6* transcript were also higher, but not significantly, in CPV4-infected samples.

The expected negative correlation between miRNA accumulation and target transcripts was observed in three of the five evaluated targets (*SPL9*, *SPL13* and *SCL6*) when infected plants and healthy controls were compared. We could not establish a correlation between the two virus isolates or between the two types of symptom when *SPL* transcript abundance was evaluated. For *SCL6*, which was the most altered transcript, we detected an apparent association pattern between CPsV 90-1-1-infected samples. These plants exhibited a significantly higher level of *SCL6* compared with the CPV4-infected samples. *ARF* transcripts appeared not to be post-transcriptionally regulated by miR167. Another possible explanation could be that its effect is either masked by the mixtures of different cell types with antagonistic regulation or rapidly regulated by feedback mechanisms.

In summary, CPsV infection down-regulates the accumulation of several mature miRNAs, with a consequent increase in some mRNA target levels, in particular *SPL9*, *SPL13* and *SCL6*.

Alteration of pre-miR156 and pre-miR171 processing in CPsV-infected *C. sinensis* plants

The reduced levels of mature miRNAs after CPsV infection could be explained primarily by three mechanisms: (i) a reduction in the

pri-miRNA transcription level; (ii) an alteration of processing of pri-miRNA into mature miRNA; and (iii) an active degradation of the mature miRNA.

To test the first hypothesis, we designed primers for the miR156a primary transcript sequence (pri-miR156a) from *C. sinensis*. This transcript of 1306 nucleotides, present in the Citrus Genome database, includes the pre-miR156a sequence (Fig. 4A). The accumulation of pri-miR156a was quantified by qRT-PCR, and remained apparently unaltered in infected leaves compared with healthy samples (Fig. 4B). To explore the possibility of pre-miRNA processing alteration (second proposed mechanism), we analysed the intermediate species generated during pre-miR156 processing by Northern blot. We have analysed previously the secondary structures of all members of the pre-miR156 family, and the data correlate with a loop-to-base processing model (Fig. S1, see Supporting Information), which is coincident with the *A. thaliana* pre-miR156 processing mechanism confirmed *in vitro* (Bologna *et al.*, 2013b; Liu *et al.*, 2012). Among the entire analysed set of pre-miRNAs (data not shown), unprocessed pre-miR156 and processing intermediates (F1 + m) were clearly detected using a probe against the mature sequence (m) (Fig. 5A, B). In *A. thaliana*, two species excised by the first cut of DCL1 have been described: a 42-nucleotide fragment including the small structured loop or upper loop, and the two arms of 45 nucleotides comprising the lower stem and mature or star sequences. A second cut renders the mature sequence (21 nucleotides) and the lower stem separately. Analogous cuts in *C. sinensis* pre-miR156a (143 nucleotides) (Fig. 5B) would also render two putative intermediates in the first cut of the proposed loop-to-base mechanism: the 41-nucleotide upper loop (F3) and two 51-nucleotide sequences comprising the lower stem and mature or star sequences (F1 + m, F2 + m*). The second cut excised the mature and lower stem species separately. Infected leaves displayed a reduced accumulation of intermediate

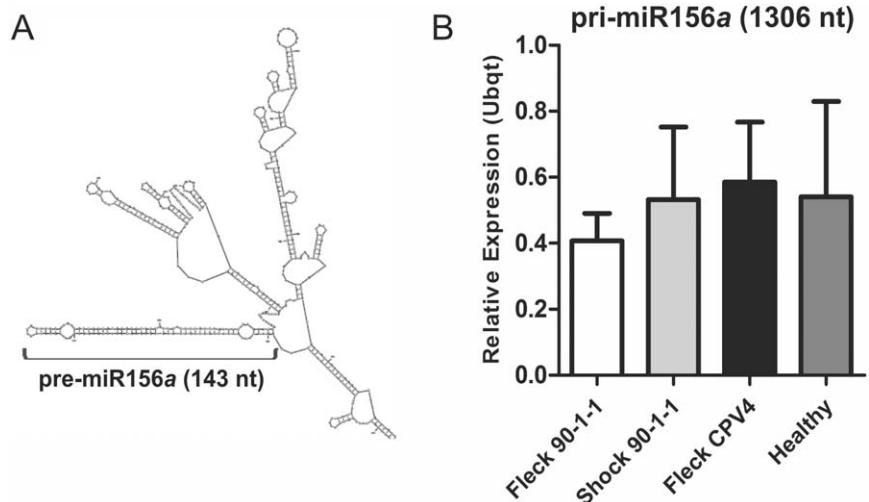


Fig. 4 *Citrus sinensis* miR156a primary transcript (pri-miR156a). (A) Predicted secondary structure of pri-miR156a (part of the molecule is shown). pre-miR156a stem loop is indicated. (B) Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) assays were performed to determine the accumulation levels of pri-miR156a in infected (Fleck 90-1-1; Shock 90-1-1; Fleck CPV4) and healthy samples. nt, nucleotide; Ubqt, ubiquitin.

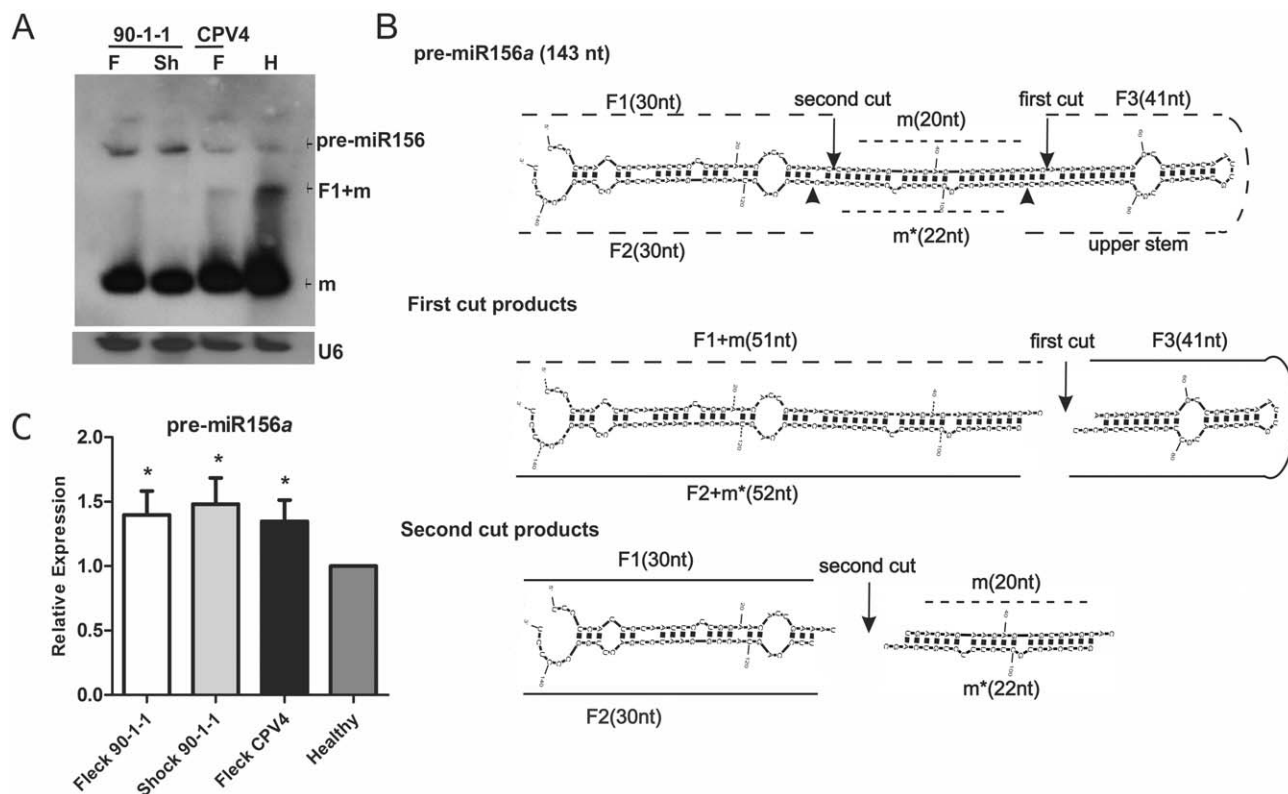


Fig. 5 pre-miR156 processing in *Citrus psorosis virus* (CPsV)-infected *Citrus sinensis*. (A) Northern blot analysis of pre-miR156 and processing intermediates after infection with CPsV 90-1-1 or CPV4 isolate using a probe against the mature species. F, flecking symptom; H, healthy leaves; Sh, shock reaction symptom. Unprocessed precursor (pre-miR156), intermediate processing fragments (F1 + m) and mature species (m) are indicated with arrows on the right. Lower panel shows U6 normalization. (B) Predicted secondary structure of *C. sinensis* pre-miR156a and predicted fragments from DICER-like 1 (DCL1)-catalysed processing. Fragments are named F1 and F2 (arm fragments), F3 (loop fragment) and m/m* [miRNA and miRNA* fragments of 20 and 22 nucleotides (nt)]. First and second cut products of processing are detailed. Labelled and unlabelled molecules in the Northern blot are indicated with broken and full lines, respectively. (C) Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) assays were performed to determine the accumulation levels of pre-miR156a in the same samples as (A). * indicates significant differences from healthy control samples at $P < 0.05$ using a two-tailed paired *t*-test.

(F1 + m) processing fragments compared with healthy leaves, and an increase in the unprocessed precursor (Fig. 5A). qRT-PCR was performed using primers designed to quantify the unprocessed pre-miR156a (Fig. 5C). These assays showed a higher accumulation of the unprocessed species in infected samples. Reverse primers were designed specifically to detect the seven members of the *C. sinensis* pre-miR156 (*a–g*), but only three (*a–c*) were detected (Fig. S2, see Supporting Information). This result agrees with previous studies which describe these three as the most abundant members of the family (Xu *et al.*, 2010).

Mature miR171 is also down-regulated by CPsV infection and has strong effects on *SCL6* target expression (Fig. 3). To evaluate whether the processing alteration is exclusive of miR156 or is also exerted by other precursors, we assessed pre-miR171a accumulation through qRT-PCR for the infected (CPsV 90-1-1 or CPV4) and healthy samples. Similar to the results described for pre-miR156a, these assays demonstrated a higher accumulation of the unprocessed precursors in the infected samples (Fig. 6).

The lower accumulation of mature and intermediate processing fragments (F1 + m) and the concomitant increase in unprocessed pre-miRNA level, without changes in the primary transcript levels, suggest that CPsV directly or indirectly interferes with miR156 processing. A similar accumulation of unprocessed species of pre-miR171a in infected samples suggests that the mechanism exerted by the virus is not restricted to one miRNA, but also extends to others.

Interaction of pre-miR156 and pre-miR171 with 24K viral protein

To examine whether CPsV proteins interact with pre-miR156 or pre-miR171, thus affecting the normal miRNA biogenesis processing, we performed RNA immunoprecipitation (RIP) assays. A previous analysis of the movement protein (54K) demonstrated that it has a bipartite nuclear localization signal (NLS) and localizes in the plasmodesmata and nucleus (confocal microscope observations;

confocal laser scanning microscopy, CLSM) (Robles Luna *et al.*, 2013). A nuclear export signal (NES) was also predicted for the 24K protein. To define the localization of this protein, we performed transient expression of 24K enhanced green fluorescent protein (eGFP)-fused protein (24K:eGFP) in *N. benthamiana* epidermal cells. Through CLSM, we found that 24K:eGFP co-localized with co-expressed free monomeric red fluorescent protein (mRFP) in the nucleus (Fig. 7). Because of this evidence, we selected these two CPsV proteins to assay the association with miRNA precursors that are also present in the nucleus.

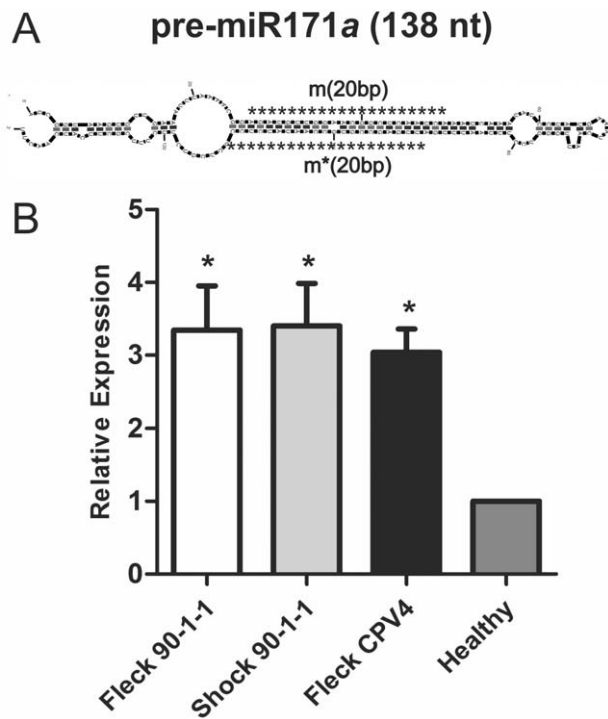
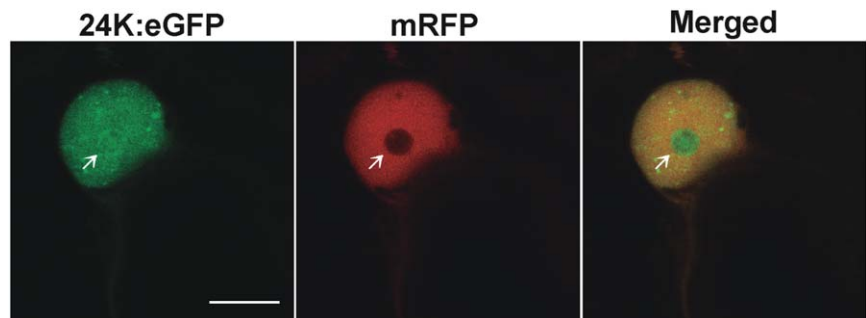


Fig. 6 *Citrus sinensis* pre-miR171a. (A) Predicted secondary structure of pre-miR171a. miRNA and miRNA* sequences of 20 nucleotides (nt) are indicated with asterisks. (B) Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) assays were performed to determine the accumulation levels of pre-miR171a in infected (Fleck 90-1-1; Shock 90-1-1; Fleck CPV4) and healthy samples. * indicates significant differences from healthy control samples at $P < 0.05$ using a two-tailed paired *t*-test.

Fig. 7 Nuclear localization of 24K:eGFP protein in *Nicotiana benthamiana*. (A) Co-expression of 24K:eGFP with free mRFP (nuclear cytoplasmic marker) at 3 days post-agroinfiltration in *N. benthamiana* epidermal cells. Merged image is shown. Scale bar, 10 μ m. Arrows indicate the nucleolus. eGFP, enhanced green fluorescent protein; mRFP, monomeric red fluorescent protein.



GFP-fused forms of CPsV 54K (54K:eGFP) (Robles Luna *et al.*, 2013) and 24K (24K:eGFP; generated here) proteins were expressed in *N. benthamiana* leaves, and total RNA was recovered by immunoprecipitation with anti-GFP from tissue expressing these CPsV proteins. *Nicotiana benthamiana* pre-miR156a and pre-miR171a were detected in the GFP immunoprecipitates and quantified by qRT-PCR. Non-fused GFP and mRFP were also tested as controls. The 24K and 54K proteins were also co-expressed to test the putative additive effect. The 24K:eGFP protein expressed alone or co-expressed with 54K:eGFP showed higher levels of enrichment of pre-miR156a (4.5- and 3.5-fold, respectively) compared with the non-fused GFP control (Fig. 8A); 54K:eGFP expressed alone showed a non-significant fold enrichment of 0.5. For pre-miR171a, 24K:eGFP expressed alone or co-expressed with 54K:eGFP showed a significant enrichment of 1.9- and 1.4-fold, respectively (Fig. 8B); 54K:eGFP expressed alone showed a non-significant 0.4-fold enrichment. The endogenous ubiquitin transcript was also tested, and no significant difference in enrichment was detected between fused viral proteins and the mRFP control (Fig. 8A, B). The presence and integrity of the viral proteins were confirmed by Western blots of input and immunoprecipitated fractions (Fig. S3, see Supporting Information).

These results suggest a direct or indirect interaction between pre-miR156a and pre-miR171a with 24K in *N. benthamiana*. This interaction could affect miRNA processing and consequently generate the observed higher accumulation of precursors and the reduction in mature miRNAs in citrus.

DISCUSSION

Plant virus infections often produce a variety of disease symptoms that can have a dramatic impact on agricultural production. Different molecules, including miRNAs, have emerged as candidates that modulate complex host-pathogen interactions (Bazzini *et al.*, 2009; Carrington and Ambros, 2003; Dorokhov *et al.*, 2007; Palatnik *et al.*, 2003). Because miRNAs can control the expression of proteins, they may influence the cellular tropism of viruses, modulate viral infectivity and play a crucial role in the induction of appropriate antiviral immune responses. It is therefore not surprising that RNA viruses may regulate the expression

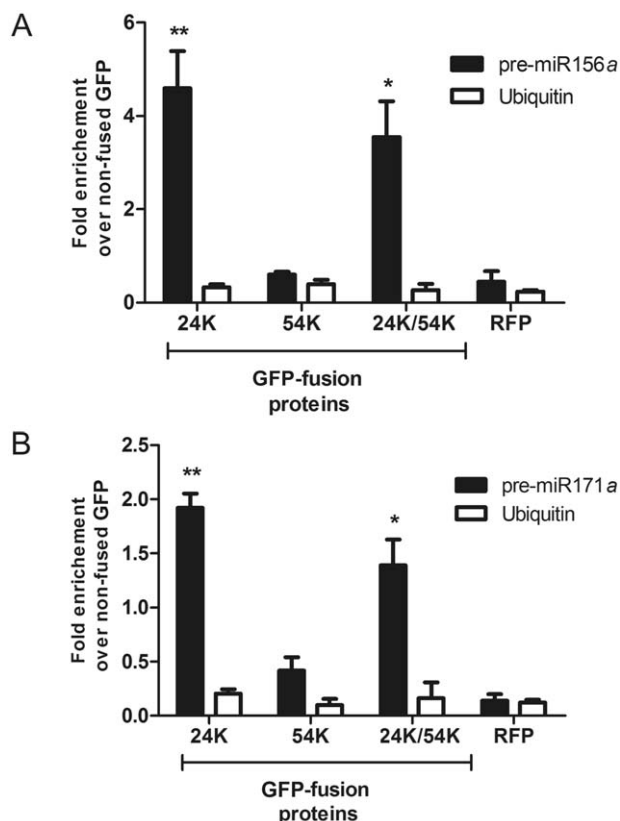


Fig. 8 Co-immunoprecipitation analysis of precursors associated with 24K and/or 54K proteins from *Citrus psorosis virus* (CPsV) in *Nicotiana benthamiana*. Transiently expressed GFP-fusion proteins were immunoprecipitated with an anti-GFP antibody. RNA samples eluted from the protein–RNA complexes were analysed by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) to determine the accumulation levels of *N. benthamiana* pre-miR156a (A) or pre-miR171a (B). Fold enrichment of the immunoprecipitated (IP) precursors was calculated by comparing the amount of RNA in the input vs. RNA in the IP (Δ CT) corrected by the input dilution factor. This value was compared for each specific IP (24K, 54K or the co-expressed 24K/54K) over the mock IP (non-fused GFP). The resulting value was used to calculate the fold enrichment [$2^{(\Delta\Delta\text{CT})}$]. Mean values and standard errors are shown ($n = 3$). Statistical analysis was performed using a two-tailed paired *t*-test; * and ** indicate significant differences from RFP control sample at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ values, respectively. GFP, green fluorescent protein; RFP, red fluorescent protein.

of specific miRNAs for efficient replication as an ever-evolving survival strategy (Swaminathan *et al.*, 2013). Infections can lead to the up- or down-regulation of host miRNAs, and can consequently produce massive gene expression changes in the host. It remains uncertain whether all the changes in miRNA pathways are adaptive strategies of viruses to exploit host gene regulation and, finally, to elude resistance responses, or whether they are just side-effects caused by shared components of silencing and miRNA pathways. Various reports support the adaptive hypothesis. For instance, *Turnip mosaic virus* infection induces Brassica miR1885, whose target is the *Toll/interleukin-1 receptor*

nucleotide-binding site-leucine-rich repeat (TIR-NBS-LRR) class of disease resistance transcripts (He *et al.*, 2008). This is in line with the hypothesis that miRNAs function as master regulators of NBS-LRRs via the targeting of highly conserved motifs (Zhai *et al.*, 2011). Other common targets, such as SPL transcription factors, that ultimately modulate similar viral resistance genes (TIR-NBS-LRR *N immune receptor*), are also candidates for such types of viral adaptive evasion of plant defence (Padmanabhan *et al.*, 2013).

In this work, we have demonstrated that the levels of a group of conserved miRNAs previously implicated in symptom development (Bazzini *et al.*, 2007) are reduced in *C. sinensis* plants infected with two different isolates of CPsV. Triboulet *et al.* (2007) first described the down-regulation of two cellular miRNAs during human immunodeficiency virus (HIV) infection in human cells. They proposed that the reduction in these miRNAs constitutes a viral mechanism for boosting the levels of proteins required for replication and spread. In this study, we report an almost three-fold reduction in miR156, miR171 and miR167 after CPsV infection. Some of their target transcripts (*SPLs*, *SCLs* and *ARFs*) have been reported previously to be related to symptom expression and defence (Gao *et al.*, 2013; Jay *et al.*, 2011; Padmanabhan *et al.*, 2013). In the present study, we found that *SPLs* and *SCL* were concomitantly up-regulated in CPsV-infected plants, but could not find a general correlation between the expression patterns of all the assessed miRNA target transcripts with the two types of exhibited symptom or with one of the two distant CPsV isolates.

Most reports including VSR-mediated mechanisms responsible for miRNA alterations involve effector pathways that comprise already processed (mature) miRNA species; the biogenesis and processing of precursors, however, may also be affected by viral infection. For example, Bazzini *et al.* (2009) reported transcriptional alterations of *A. thaliana* miR164 by ORMV infection. Lu & Cullen (2004) demonstrated that the adenovirus VA1 RNA inhibits the biogenesis of miRNAs by hampering the nuclear export of pre-miRNA precursors and by preventing Dicer function through binding. Here, we have demonstrated that citrus plants infected with CPsV show a reduction in pre-miR156 and pre-miR171 processing, which leads to greater amounts of precursors and decreased amounts of mature species. Furthermore, the alteration of pre-miR156a levels by transcriptional activation of the *MIR156a* gene can be discarded, which supports the hypothesis that pre-miR156a processing is the affected pathway.

Two main hypotheses emerge to explain the processing alterations: (i) the viral proteins can inhibit directly components of the miRNA processing machinery; and (ii) the viral protein can bind miRNA precursors impeding its processing. In relation to the first hypothesis, the dsRNA-binding protein HYL1, which interacts with DCL1 and assists the efficient and precise cleavage of miRNA precursors (Kurihara *et al.*, 2006), is crucial for the

efficient processing of miR156a (Liu *et al.*, 2012). Other studies by Li *et al.* (2012) have revealed that most of the miRNAs are down-regulated in *A. thaliana hyl1* mutants and that miR156a-f is the most down-regulated, reaching more than 10-fold reduction compared with wild-type plants. Here, we showed that miR156 accumulation is the most affected by CPsV infection and that miR156 processing is also clearly altered. Therefore, a CPsV protein or a complex of CPsV proteins could interact with HYL1 during infection, thus limiting its function and ultimately affecting the processing of miR156. The nuclear localization of 24K (this study) and 54K (Robles Luna *et al.*, 2013) also favours the idea of an interaction with DCL1, HYL1, SERRATE and/or components of the cap-binding complex, which are present in the same compartment. In relation to the second hypothesis, the immunoprecipitation experiments revealed an association between 24K and pre-miR156a or pre-miR171a, thus suggesting an interaction of these proteins with miRNA precursors in the nucleus. Other results have also shown that 24K and 54K can potentially bind synthetic long dsRNAs *in vitro* (C. A. Reyes, IBBM, La Plata, Argentina. unpublished data), which supports direct interaction impeding the normal processing of the miRNA precursor by the biogenesis machinery. However, the role of CPsV viral proteins in the alteration of miRNA processing by both mechanisms cannot be discarded.

Recent reports involving miR156 in responses to different stresses may explain the observed effect in miR156 and its targets. Cui *et al.* (2014) associated miR156 and *SPL9* accumulation with abiotic stress tolerance in *A. thaliana*. Moreover, *SPL* transcription factors play a regulatory role in the resistance to the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* in *A. thaliana* and to TMV infection in *N. benthamiana*. These factors appeared to be implicated in the transcription of key immune response genes involved in the induction of the hypersensitive response and programmed cell death (HR-PCD) (Padmanabhan *et al.*, 2013).

We have reported here that infected young shoots, previous to necrosis, accumulate large amounts of *SPL* transcripts, which is concomitant with a decrease in mature miR156 caused by viral-mediated misprocessing. The involvement of these transcription factors in the activation of genes related to necrosis and PCD in CPsV-infected citrus plants would be an interesting feature to assess. Similarly, the accumulation of *SCL* transcripts (the most affected target in CPsV 90-1-1-infected plants) and the reduction in mature miR171 can be associated with chlorophyll biosynthesis regulation, as described by Ma *et al.* (2014). In that report, it is proposed that light promotes miR171 expression, which leads to a concomitant decrease in *SCL* expression with an increase in chlorophyll biosynthesis (Ma *et al.*, 2014). In the case of CPsV 90-1-1-infected plants, larger amounts of miR171-targeted *SCL6* could negatively regulate chlorophyll biosynthesis, thus contributing to the chlorosis manifested in CPsV-infected leaves.

As mentioned previously, there are a few examples of DNA viruses (adenoviruses) interfering with pre-miRNA processing (Lu and Cullen, 2004), but no study has been described in plant viruses, most with exclusive cytoplasmic cycles. In this study, we assessed this mechanism for CPsV, a segmented RNA virus that has a nuclear component affecting miRNA processing. Further studies are needed to fully characterize the molecular basis of the proposed interaction between CPsV viral proteins and miRNA precursors and/or the components of the biogenesis machinery in *C. sinensis*. Our results also provide insight into the host-pathogen interaction of a worldwide important crop, sweet orange. Little is known about citrus miRNA regulation, role and function, or about the molecular mechanisms of viral infection. The elucidation of the role of miRNAs during symptom expression and pathogenesis in citrus would also help in the design of new molecular approaches to reduce economic losses.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plant citrus material and CPsV isolates

The CPsV isolates used in this study were the Argentine CPsV 90-1-1 (INTA, Concordia, Argentina) (García *et al.*, 1993) and CPV4 (USA) (Garney *et al.*, 1976). CPV4 is the most distant isolate among the three groups established by Martin *et al.* (2006). Pineapple sweet orange plants [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] were infected by graft inoculation using a small chip taken from infected bark tissue. The chip was inserted in the stem (Roistacher, 1991).

Virus detection

For CPsV infection analysis, triple antibody sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (TAS-ELISA) or dot blots were performed. TAS-ELISA-horseradish peroxidase (TAS-ELISA-HRP) was performed as described previously by Zaneke *et al.* (2006) using total protein extracted from 200 mg of leaf tissue. Dot blots were performed using serial dilutions (1 µg to 1 ng) of all samples. Probes for the *cp* gene were used and hybridizations were performed according to Reyes *et al.* (2009).

Plasmid constructs and bacterial strains

To express gfp-24K fusion protein (pB7FWG2-24K), we cloned the open reading frame (ORF) without the stop codon into pCR8/GW/TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA.). The resulting entry plasmids were digested with *Xho*I and recombined with destination vectors pB7FWG2 (Karimi *et al.*, 2002) using LR clonase mix (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The correct cloning and insert orientation were confirmed by sequencing. The verified construct was transferred to *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 by electroporation.

miRNA isolation and detection

For miRNA analysis by Northern blot, total RNA was extracted from citrus leaves using TriReagent® (Molecular Research Center, Inc. Cincinnati, OH,

USA.). Total RNA from each sample was separated in denaturing polyacrylamide gels, transferred to a positively charged nylon membrane (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA) by a Bio-Rad (Hercules CA, USA) transfer unit and chemically fixed according to Pall and Hamilton (2008). Probes were ³²P-radiolabelled oligodeoxynucleotides complementary to the mature miRNA or to the U6 snRNA sequence, which was included as a loading control (Table S1). Hybridizations were performed at 50 °C overnight and signals were detected by autoradiography. Band intensity was quantified using ImageJ software. Data from U6 quantification were used for normalization. The value for the miRNA species in healthy plants was set at 1.0 (Fig. 2A). The data shown in Fig. 2B are the mean of three independent experiments.

Target detection

For qRT-PCR analysis of the target transcripts, we synthesized first-strand cDNA from total DNase-treated RNA using oligodT and MMLV (Promega Madison, WI, USA.). cDNA was used as a template for PCRs. PCR was performed with an iCycler iQ (Bio-Rad) and SYBR-GREEN Master mix (Bio-Rad) in a reaction held at 95 °C for 5 min, then 44 cycles of 20 s at 95 °C, 30 s at 56 °C and 20 s at 72 °C, followed by 10 min at 72 °C. Gene-specific primers are indicated in Table S1. The presence of a unique product of the expected size was verified on ethidium bromide-stained agarose gels. The absence of contaminant genomic DNA was confirmed in reactions with DNase-treated RNA as the template. *Citrus sinensis* ubiquitin amplification was used to normalize the amount of template cDNA. The reproducibility of the assay was monitored by running technical triplicates. At least three biological replicates were performed. Primers for *C. sinensis* target detection were designed using citrus sequences deposited in GenBank and the citrus expressed sequence tag (EST) database (Version 1.20 HarvEST:Citrus) (Table S1). The *SPL* sequences come from *Poncirus trifoliata* ESTs and were validated as a miR156 target by RNA ligase-mediated 5'-rapid amplification of cDNA ends (5'-RACE) (Song *et al.*, 2010a). *SPL9* (FJ502237.1) is a homologue of AT2G42200 and *SPL13* (FJ502238.1) is a homologue of AT5G50570. The *SCL6* (GQ505957.1) sequence belongs to *Citrus trifoliata* and is a homologue of the GRAS family of the transcription factor AT4G00150.1. The *ARF6* (UNIGEN-15948, HarvEST:citrus) and *ARF8* (UNIGEN-30530, HarvEST:citrus) sequences from *C. sinensis* are homologues of AT1G30330 and AT5G37020. The ubiquitin transcript GU362416.1 from *C. sinensis* was used as an internal control (Boava *et al.*, 2011).

pri-miRNA and pre-miRNA detection and bioinformatic analysis

The qRT-PCR analyses of pri-miR156 and pre-miR156 or pre-miR171 were performed as described previously for target transcripts using specific primers (Table S1). The annealing temperature was 49 °C. The sequence from pri-miR156a (orange1.1g034943m|PACid:18109087) was obtained from the transcript dataset of the Citrus Genome database. The sequences from pre-miR156 and pre-miR171 families were taken from Xu *et al.* (2013). Secondary structures were obtained using the Mfold program (Zuker, 2003), with default parameters. In Fig. S1, the proximal end of the miRNA/miRNA* duplex was defined as position +1. Matched positions were rated as 0, whereas unpaired positions were considered as +1. The average for all the family members was calculated.

Immunoprecipitation of RNA-binding proteins (RIP)

pB7FWG2-24K (generated in this study; see 'Plasmid constructs and bacterial strains' section) and/or pB7FWG2-54K (Robles Luna *et al.*, 2013) constructs expressing eGFP-fused proteins were transiently expressed in *N. benthamiana* plants using *A. tumefaciens* GV3101 strain. Cells were harvested by centrifugation, suspended in water to a final optical density at 600 nm (OD_{600nm}) of 0.4 and injected into the abaxial side of the leaf using a syringe without a needle. Leaves were observed in a Nikon fluorescence microscope (Eclipse Ti) (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) under UV light at 4 days post-agroinfiltration (dpi). Non-fused eGFP and mRFP constructs were used as controls (Pena *et al.*, 2012; Robles Luna *et al.*, 2013).

The agroinfiltrated leaves were cross-linked *in vivo* with 1% formaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4) by vacuum infiltration for 20 min at room temperature to fix protein–nucleic acid. The reaction was stopped with 125 mM glycine. Co-immunoprecipitation assays were performed with GFP-Trap®_A according to the manufacturer's instructions (Chromotek, Planegg-Martinsried Germany) with minor modifications. Total plant proteins were extracted with modified lysis buffer supplemented with 0.1% sodium dodecylsulfate (SDS), 1% Triton, 1% sodium deoxycholate, 5 mM dithiothreitol (DTT) and 50 U of RNasin (Promega). The protein extracts were diluted with dilution buffer without Tween 20 to reduce the detergent concentration to 0.15%. An aliquot of the dilution was saved as input. The extracts were incubated with 20 µL of GFP-Trap A slurry for 1 h at 4 °C. After centrifugation at 3000 g and 4 °C for 5 min, the agarose beads were washed four times with ice-cold washing buffer supplemented with 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 2 M urea and 2 mM DTT. Then, 400 µL of TriReagent® (Molecular Research Center, Inc.) was added to the agarose beads and to the saved input. Incubation of the agarose beads at 55 °C for 5 min allows reversion of formaldehyde cross-linking. RNA was extracted as described by the manufacturer for further cDNA synthesis. Immunoprecipitated proteins were recovered from TriReagent® organic phase.

The expression, size and integrity of the fusion proteins were confirmed by Western blot in the input and immunoprecipitated fractions as described previously by Robles Luna *et al.* (2013).

Fluorescence microscopy

CLSM was performed using a Zeiss (Oberkochen, Germany) LSM510 microscope with a C-Apo-chromat (63/1.2 W Korr) water objective lens in multitrack mode, excitation/emission wavelengths of 488 nm/505–550 nm for eGFP and 561 nm/575–615 nm for mRFP, and LSM510 version 2.8 software. Images were processed with ImageJ software.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Ing. Agr. Norma Costa and Pto. Agr. Fabián Ramos (Estación Experimental Agropecuaria, INTA-Concordia) and Tec. Agr. Claudio Mazo (IBBM, CCT-La Plata-CONICET-UNLP) for providing *C. sinensis* plants. We thank Eduardo Peña and Julia Sabio for critical reading of the manuscript.

MLG, CAR, EEO, FEM, GRL and MBB belong to the staff of IBBM, CCT-La Plata-CONICET-UNLP. AAB belongs to the staff of the Department

of Genetics, Yale University School of Medicine, and SA belongs to the staff of Instituto de Biotecnologia, CICVyA-INTA. MLG, CAR and SA are recipients of research career awards from CONICET. EO, GRL and MBB are fellows of CONICET. This work was supported by grants from BID802-OC-AR PICT-1094, PICT-1726 and PICT-1019 ANPCyT, Argentina.

REFERENCES

- Amin, I., Patil, B.L., Briddon, R.W., Mansoor, S. and Fauquet, C.M. (2011) A common set of developmental miRNAs are upregulated in *Nicotiana benthamiana* by diverse begomoviruses. *Virology*, **1**, 8, 143.
- Anderson, C. (2000) Presentation on the Argentinean certification program. *Proceedings of the Global Citrus Germplasm Network: 9th Congress of the International Society of Citriculture*, Orlando, Florida, USA 7-8 December 2000. Edited by Leo G., Albrigo, Published by Food and Agricultural Organization, United Nations, Seed and Genetic Resources Division. Access at this publication is in: www.crec.ifas.ufl.edu/societies/ISC/gcgn/WG_3.PDF
- Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, **116**, 281–297.
- Bazzini, A.A., Hopp, H.E., Beachy, R.N. and Asurmendi, S. (2007) Infection and coaccumulation of tobacco mosaic virus proteins alter microRNA levels, correlating with symptom and plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 12 157–12 162.
- Bazzini, A.A., Almasia, N.I., Manacorda, C.A., Mongelli, V.C., Conti, G., Maroniche, G.A., Rodriguez, M.C., Distefano, A.J., Hopp, H.E., del Vas, M. and Asurmendi, S. (2009) Virus infection elevates transcriptional activity of miR164a promoter in plants. *BMC Plant Biol.* **9**, 152.
- Boava, L.P., Cristofani-Yaly, M., Mafra, V.S., Kubo, K., Kishi, L.T., Takita, M.A., Ribeiro-Alves, M. and Machado, M.A. (2011) Global gene expression of *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki* and their hybrids under infection of *Phytophthora parasitica*. *BMC Genomics*, **12**, 39.
- Bolle, C. (2004) The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta*, **218**, 683–692.
- Bologna, N.G., Mateos, J.L., Bresso, E.G. and Palatnik, J.F. (2009) A loop-to-base processing mechanism underlies the biogenesis of plant microRNAs miR319 and miR159. *EMBO J.* **28**, 3646–3656.
- Bologna, N.G., Schapire, A.L. and Palatnik, J.F. (2013a) Processing of plant microRNA precursors. *Brief. Funct. Genomics*, **12**, 37–45.
- Bologna, N.G., Schapire, A.L., Zhai, J., Chorostek, U., Boisbouvier, J., Meyers, B.C. and Palatnik, J.F. (2013b) Multiple RNA recognition patterns during microRNA biogenesis in plants. *Genome Res.* **23**, 1675–1689.
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y.Y., Sieburth, L. and Voinnet, O. (2008) Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*, **320**, 1185–1190.
- Cardon, G., Hohmann, S., Klein, J., Nettesheim, K., Saedler, H. and Huijser, P. (1999) Molecular characterisation of the Arabidopsis SBP-box genes. *Gene*, **237**, 91–104.
- Cardon, G.H., Hohmann, S., Nettesheim, K., Saedler, H. and Huijser, P. (1997) Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* SBP-box gene SPL3: a novel gene involved in the floral transition. *Plant J.* **12**, 367–377.
- Carrington, J.C. and Ambros, V. (2003) Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*, **301**, 336–338.
- Cazalla, D., Yario, T. and Steitz, J.A. (2010) Down-regulation of a host microRNA by a Herpesvirus saimiri noncoding RNA. *Science*, **328**, 1563–1566.
- Chapman, E.J., Prokhnovsky, A.I., Gopinath, K., Dolja, V.V. and Carrington, J.C. (2004) Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev.* **18**, 1179–1186.
- Chen, J., Li, W.X., Xie, D., Peng, J.R. and Ding, S.W. (2004) Viral virulence protein suppresses RNA silencing-mediated defense but upregulates the role of microRNA in host gene expression. *Plant Cell*, **16**, 1302–1313.
- Cui, L.G., Shan, J.X., Shi, M., Gao, J.P. and Lin, H.X. (2014) The miR156-SPL9-DFR pathway coordinates the relationship between development and abiotic stress tolerance in plants. *Plant J.* **80**, 1108–1117.
- Dorokhov, Iu, L. (2007) [Gene silencing in plants]. *Mol. Biol. (Mosk)*, **41**, 579–592.
- Dunoyer, P., Lecellier, C.H., Parizotto, E.A., Himber, C. and Voinnet, O. (2004) Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell*, **16**, 1235–1250.
- Fang, Y. and Spector, D.L. (2007) Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living Arabidopsis plants. *Curr. Biol.* **17**, 818–823.
- Fujioka, Y., Utsumi, M., Ohba, Y. and Watanabe, Y. (2007) Location of a possible miRNA processing site in SmD3/SmB nuclear bodies in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **48**, 1243–1253.
- Gao, R., Wan, Z.Y. and Wong, S.M. (2013) Plant growth retardation and conserved miRNAs are correlated to Hibiscus chlorotic ringspot virus infection. *PLoS ONE*, **8**, e85476.
- Garcia, M.L., Dal Bo, E., Grau, O. and Milne, R.G. (1994) The closely related citrus ringspot and citrus psorosis viruses have particles of novel filamentous morphology. *J. Gen. Virol.* **75** (Pt 12), 3585–3590.
- Garcia, M.L., Derrick, K.S. and Grau, O. (1993) Citrus psorosis associated virus and Citrus ringspot virus belong to a new virus group. In: *Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. pp. 430–431. Edited by Moreno, P., da Graça, J.V. and Timmer, L.W., Published by IOCV, University of California, Riverside, CA.
- Garnsey, S.M., Youtsey, C.O., Bridges, G.D. and Burnett, H.C. (1976) A necrotic ringspot-like virus found in a 'Star Ruby' grapefruit tree imported without authorization from Texas. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* **89**, 63–67.
- Gregory, B.D., O'Malley, R.C., Lister, R., Urlich, M.A., Tonti-Filippini, J., Chen, H., Millar, A.H. and Ecker, J.R. (2008) A link between RNA metabolism and silencing affecting Arabidopsis development. *Dev. Cell*, **14**, 854–866.
- Han, M.H., Goud, S., Song, L. and Fedoroff, N. (2004) The Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 1093–1098.
- He, X.F., Fang, Y.Y., Feng, L. and Guo, H.S. (2008) Characterization of conserved and novel microRNAs and their targets, including a TuMV-induced TIR-NBS-LRR class R gene-derived novel miRNA in Brassica. *FEBS Lett.* **582**, 2445–2452.
- Jay, F., Wang, Y., Yu, A., Taconnat, L., Pelletier, S., Colot, V., Renou, J.P. and Voinnet, O. (2011) Misregulation of AUXIN RESPONSE FACTOR 8 underlies the developmental abnormalities caused by three distinct viral silencing suppressors in Arabidopsis. *Plos Pathog.* **7**, e1002035.
- Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P. and Bartel, B. (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 19–53.
- Karimi, M., Inze, D. and Depicker, A. (2002) GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* **7**, 193–195.
- Kasschau, K.D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E.J., Krizan, K.A. and Carrington, J.C. (2003) P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Dev. Cell*, **4**, 205–217.
- Klein, J., Saedler, H. and Huijser, P. (1996) A new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the *Antirrhinum majus* floral meristem identity gene SQUAMOSA. *Mol. Gen. Genet.* **250**, 7–16.
- Kurihara, Y. and Watanabe, Y. (2004) Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12 753–12 758.
- Kurihara, Y., Takashi, Y. and Watanabe, Y. (2006) The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA*, **12**, 206–212.
- Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E.J., Carrington, J.C., Liu, Y.P., Dolja, V.V., Calvino, L.F., Lopez-Moya, J.J. and Burgoyne, J. (2006) Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J.* **25**, 2768–2780.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H. and Kim, V.N. (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* **23**, 4051–4060.
- Li, S., Yang, X., Wu, F. and He, Y. (2012) HYL1 controls the miR156-mediated juvenile phase of vegetative growth. *J. Exp. Bot.* **63**, 2787–2798.
- Liu, C., Axtell, M.J. and Fedoroff, N.V. (2012) The helicase and RNaseIII domains of Arabidopsis Dicer-Like1 modulate catalytic parameters during microRNA biogenesis. *Plant Physiol.* **159**, 748–758.
- Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K.D. and Carrington, J.C. (2002) Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science*, **297**, 2053–2056.
- Llobes, D., Rallapalli, G., Schmidt, D.D., Martin, C. and Clarke, J. (2006) SERRATE: a new player on the plant microRNA scene. *EMBO Rep.* **7**, 1052–1058.
- Lu, S. and Cullen, B.R. (2004) Adenovirus VA1 noncoding RNA can inhibit small interfering RNA and MicroRNA biogenesis. *J. Virol.* **78**, 12 868–12 876.
- Ma, Z., Hu, X., Cai, W., Huang, W., Zhou, X., Luo, Q., Yang, H., Wang, J. and Huang, J. (2014) Arabidopsis miR171-targeted scarecrow-like proteins bind to GT elements and mediate gibberellin-regulated chlorophyll biosynthesis under light conditions. *Plos Genet.* **10**, e1004519.

- Martin, S., Garcia, M.L., Troisi, A., Rubio, L., Legarreta, G., Grau, O., Alioto, D., Moreno, P. and Guerri, J. (2006) Genetic variation of populations of Citrus psorosis virus. *J. Gen. Virol.* **87**, 3097–3102.
- Mateos, J.L., Bologna, N.G., Chorostecki, U. and Palatnik, J.F. (2010) Identification of microRNA processing determinants by random mutagenesis of Arabidopsis MIR172a precursor. *Curr. Biol.* **20**, 49–54.
- Milne, R.G., Garcia, M.L. and Moreno, P. (2003) Citrus psorosis virus. *Association of Applied Biologists. Descriptions of Plant Viruses*. Available at <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=401>. Date accessed: 18th June, 2015.
- Moxon, S., Jing, R., Szitty, G., Schwach, F., Rusholme Pilcher, R.L., Moulton, V. *et al.* (2008) Deep sequencing of tomato short RNAs identifies microRNAs targeting genes involved in fruit ripening. *Genome Res.* **18**, 1602–1609.
- Naqvi, A.R., Haq, Q.M. and Mukherjee, S.K. (2010) MicroRNA profiling of tomato leaf curl New Delhi virus (toLCDNV) infected tomato leaves indicates that deregulation of mir159/319 and mir172 might be linked with leaf curl disease. *Virol. J.* **7**, 281.
- Naum-Ongania, G., Gago-Zachert, S., Pena, E., Grau, O. and Garcia, M.L. (2003) Citrus psorosis virus RNA 1 is of negative polarity and potentially encodes in its complementary strand a 24K protein of unknown function and 280K putative RNA dependent RNA polymerase. *Virus Res.* **96**, 49–61.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O. and Jones, J.D. (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*, **312**, 436–439.
- Padmanabhan, M.S., Ma, S., Burch-Smith, T.M., Czymmek, K., Huijser, P. and Dinesh-Kumar, S.P. (2013) Novel positive regulatory role for the SPL6 transcription factor in the N TIR-NB-LRR receptor-mediated plant innate immunity. *Plos Pathog.* **9**, e1003235.
- Palatnik, J.F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J.C. and Weigel, D. (2003) Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*, **425**, 257–263.
- Pall, G.S. and Hamilton, A.J. (2008) Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA. *Nat. Protoc.* **3**, 1077–1084.
- Park, M.Y., Wu, G., Gonzalez-Sulser, A., Vaucheret, H. and Poethig, R.S. (2005) Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 3691–3696.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J. and Chen, X. (2002) CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in Arabidopsis thaliana. *Curr. Biol.* **12**, 1484–1495.
- Pena, E.J., Robles Luna, G., Zaneck, M.C., Borniego, M.B., Reyes, C.A., Heinlein, M. and Garcia, M.L. (2012) Citrus psorosis and Mirafiori lettuce big-vein ophiovirus coat proteins localize to the cytoplasm and self interact in vivo. *Virus Res.* **170**, 34–43.
- Pfeffer, S. and Voinnet, O. (2006) Viruses, microRNAs and cancer. *Oncogene*, **25**, 6211–6219.
- Reyes, C.A., Pena, E.J., Zaneck, M.C., Sanchez, D.V., Grau, O. and Garcia, M.L. (2009) Differential resistance to Citrus psorosis virus in transgenic *Nicotiana benthamiana* plants expressing hairpin RNA derived from the coat protein and 54K protein genes. *Plant Cell Rep.* **28**, 1817–1825.
- Robles Luna, G., Pena, E.J., Borniego, M.B., Heinlein, M. and Garcia, M.L. (2013) Ophioviruses CPsV and MiLBVV movement protein is encoded in RNA 2 and interacts with the coat protein. *Virology*, **441**, 152–161.
- Roistacher, C.N. and International Organization of Citrus Virologists. and Food and Agriculture Organization of the United Nations (1991) *Graft-Transmissible Diseases of Citrus: Handbook for Detection and Diagnosis*. Rome: International Organization of Citrus Virologists: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Ruiz-Ruiz, S., Navarro, B., Gisela, A., Pena, L., Navarro, L., Moreno, P., Di Serio, F. and Flores, R. (2011) Citrus tristeza virus infection induces the accumulation of viral small RNAs (21–24-nt) mapping preferentially at the 3'-terminal region of the genomic RNA and affects the host small RNA profile. *Plant Mol. Biol.* **75**, 607–619.
- Sánchez de la Torre, E., Riva, O., Zandomeni, R., Grau, O. and García, M.L. (1998) The top component of citrus psorosis virus contains two ssRNAs, the smaller encodes the coat protein. *Mol. Plant Pathol. On-Line*. Available at <http://www.bspp.org.uk/mpol/abstract/1019sanc.htm>. Date accessed: 18th June, 2015.
- Schwab, R., Palatnik, J.F., Riester, M., Schommer, C., Schmid, M. and Weigel, D. (2005) Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Dev. Cell*, **8**, 517–527.
- Silhavy, D. and Burgyn, J. (2004) Effects and side-effects of viral RNA silencing suppressors on short RNAs. *Trends Plant Sci.* **9**, 76–83.
- Singh, K., Talla, A. and Qiu, W. (2012) Small RNA profiling of virus-infected grapevines: evidence for virus infection-associated and variety-specific miRNAs. *Funct. Integr. Genomics*, **12**, 659–669.
- Song, C., Jia, Q., Fang, J., Li, F., Wang, C. and Zhang, Z. (2010a) Computational identification of citrus microRNAs and target analysis in citrus expressed sequence tags. *Plant Biol. (Stuttg.)*, **12**, 927–934.
- Song, C., Wang, C., Zhang, C., Korir, N.K., Yu, H., Ma, Z. and Fang, J. (2010b) Deep sequencing discovery of novel and conserved microRNAs in trifoliate orange (*Citrus trifoliata*). *BMC Genomics*, **11**, 431.
- Song, L., Han, M.H., Lesicka, J. and Fedoroff, N. (2007) Arabidopsis primary microRNA processing proteins HYL1 and DCL1 define a nuclear body distinct from the Cajal body. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 5437–5442.
- Swaminathan, G., Martin-Garcia, J. and Navas-Martin, S. (2013) RNA viruses and microRNAs: challenging discoveries for the 21st century. *Physiol. Genomics*, **45**, 1035–1048.
- Tagami, Y., Inaba, N., Kutsuna, N., Kurihara, Y. and Watanabe, Y. (2007) Specific enrichment of miRNAs in *Arabidopsis thaliana* infected with Tobacco mosaic virus. *DNA Res.* **14**, 227–233.
- Triboulet, R., Mari, B., Lin, Y.L., Chable-Bessia, C., Bennisser, Y., Lebrigand, K., Cardinaud, B., Maurin, T., Barbry, P., Baillat, V., Reynes, J., Corbeau, P., Jeang, K.T. and Benkirane, M. (2007) Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication. *Science*, **315**, 1579–1582.
- Vazquez, F., Gascoli, V., Crete, P. and Vaucheret, H. (2004) The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing. *Curr. Biol.* **14**, 346–351.
- Wang, C., Han, J., Liu, C., Kibet, K.N., Kayesh, E., Shangquan, L., Li, X. and Fang, J. (2012) Identification of microRNAs from Amur grape (*Vitis amurensis* Rupr.) by deep sequencing and analysis of microRNA variations with bioinformatics. *BMC Genomics*, **13**, 122.
- Wu, M.F., Tian, Q. and Reed, J.W. (2006) Arabidopsis microRNA167 controls patterns of ARF6 and ARF8 expression, and regulates both female and male reproduction. *Development*, **133**, 4211–4218.
- Xie, Z., Allen, E., Fahlgren, N., Calamar, A., Givan, S.A. and Carrington, J.C. (2005) Expression of Arabidopsis MIRNA genes. *Plant Physiol.* **138**, 2145–2154.
- Xu, Q., Liu, Y., Zhu, A., Wu, X., Ye, J., Yu, K., Guo, W. and Deng, X. (2010) Discovery and comparative profiling of microRNAs in a sweet orange red-flesh mutant and its wild type. *BMC Genomics*, **11**, 246.
- Xu, Q., Chen, L.L., Ruan, X., Chen, D., Zhu, A., Chen, C., Bertrand, D., Jiao, W.B., Hao, B.H., Lyon, M.P., Chen, J., Gao, S., Xing, F., Lan, H., Chang, J.W., Ge, X., Lei, Y., Hu, Q., Miao, Y., Wang, L., Xiao, S., Biswas, M.K., Zeng, W., Guo, F., Cao, H., Yang, X., Xu, X.W., Cheng, Y.J., Xu, J., Liu, J.H., Luo, O.J., Tang, Z., Guo, W.W., Kuang, H., Zhang, H.Y., Roose, M.L., Nagarajan, N., Deng, X.X. and Ruan, Y. (2013) The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nat. Genet.* **45**, 59–66.
- Yin, X., Wang, J., Cheng, H., Wang, X. and Yu, D. (2013) Detection and evolutionary analysis of soybean miRNAs responsive to soybean mosaic virus. *Planta*, **237**, 1213–1225.
- Zaneck, M.C., Pena, E., Reyes, C.A., Figueroa, J., Stein, B., Grau, O. and Garcia, M.L. (2006) Detection of Citrus psorosis virus in the northwestern citrus production area of Argentina by using an improved TAS-ELISA. *J. Virol. Methods*, **137**, 245–251.
- Zhai, J., Jeong, D.H., De Paoli, E., Park, S., Rosen, B.D., Li, Y., Gonzalez, A.J., Yan, Z., Kitto, S.L., Grusak, M.A., Jackson, S.A., Stacey, G., Cook, D.R., Green, P.J., Sherrier, D.J. and Meyers, B.C. (2011) MicroRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, trans-acting siRNAs. *Genes Dev.* **25**, 2540–2553.
- Zhu, H., Xia, R., Zhao, B., An, Y.Q., Dardick, C.D., Callahan, A.M. and Liu, Z. (2012) Unique expression, processing regulation, and regulatory network of peach (*Prunus persica*) miRNAs. *BMC Plant Biol.* **12**, 149.
- Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3406–3415.

AUTHOR-RECOMENDED INTERNET RESOURCES

The National Center for Biotechnology Information website: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

miRBase: <http://www.mirbase.org/>
 HarvEST: Citrus: <http://harvest.ucr.edu>
 Citrus Genome database: <http://www.citrusgenomedb.org/>
<http://bti.cornell.edu/research/projects/nicotiana-benthamiana/>
 The Mfold Web Server: <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/>
 Food and Agriculture Organization of the United Nations: (FAO statistics), <http://faostat.fao.org/default.aspx>
 GraphPad software: <http://www.graphpad.com>
 ImageJ software: <http://imagej.nih.gov/ij/>

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's website:

Fig. S1 Processing model of *Citrus sinensis* miR156 family of precursors. Average for the seven members (*C. sinensis* pre-miR156 *a–g*) is shown. A structured region (upper stem) of a conserved length of around 42 nucleotides with a short loop coincides with the loop-to-base model of processing (Bologna *et al.*, 2013b). Structures were predicted based on Mfold (Zuker, 2003). The proximal end of the miRNA/miRNA* duplex was defined as position +1. Matches in each position were considered as 0, whereas bulges and mismatches were considered as 1.

Fig. S2 Detection of pre-miR156 family members. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assays to detect *Citrus sinensis* pre-miR156*a*, *b* and *c*. Ubq, ubiquitin used as internal control. Sizes: Ubq, 193 bp; pre156*a*, 83 bp; pre156*b*, 106 bp; pre156*c*, 136 bp.

Fig. S3 Western blot analysis of transiently expressed 24K or 54K of *Citrus psorosis virus* (CPsV) or co-expression of both (24K/54K) in *Nicotiana benthamiana* plants before (INPUT) and after (IP) RNA immunoprecipitation. The two fractions were analysed using anti-green fluorescent protein (α -GFP) antibodies for the GFP-fused viral proteins (left panels) or anti-red fluorescent protein (α -RFP) antibodies for the RFP control (right panels). Coomassie blue-stained sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) is shown in the lower panel of the INPUT fraction as a loading control.

Table S1 Oligonucleotides used for probes and primers for miRNA, targets, miRNA precursors and internal controls for detection in *Citrus sinensis* and *Nicotiana benthamiana*.

Table S2 Virus quantification in tissues infected with *Citrus psorosis virus* (CPsV) 90-1-1 or CPV4 isolate expressing each characteristic symptom (F, flecking symptom; Sh, shock reaction symptom; H, healthy leaves).

METHODOLOGY

Open Access



RNA-binding protein immunoprecipitation as a tool to investigate plant miRNA processing interference by regulatory proteins of diverse origin

F. E. Marmisolle, M. L. García and C. A. Reyes* 

Abstract

Background: Due to the nature of viral RNA genomes, RNA viruses depend on many RNA-binding proteins (RBP) of viral and host origin for replication, dissemination and evasion of host RNA degradation pathways. Some viruses interfere with the microRNA (miRNA) pathway to generate better fitness. The development of an adjusted, reliable and sensitive ribonucleoprotein immunoprecipitation (RIP) assay is needed to study the interaction between RBP of different origin (including viral origin) and miRNA precursors. The method could be further applied to transiently expressed heterologous proteins in different plant species.

Results: Here we describe a modified RIP assay applied to nuclear epitope-tagged proteins of heterologous origin and transiently expressed in *Nicotiana benthamiana*. The assay includes a combination of optimized steps as well as the careful selection of control samples and rigorous data analysis. It has proven efficient to detect and quantify miRNA processing intermediates associated with regulatory proteins.

Conclusions: The RIP method described here provides a reliable tool to study the interaction of RBPs, such as transiently expressed regulatory proteins with lowly represented host RNA, as is the case of miRNA precursors. This modified method was efficiently adjusted to recover nuclear proteins and reduce unspecific background. The purification scheme optimized here for GFP-tagged proteins can be applied to a wide array of RBPs. The subsequent application of next-generation sequencing technologies will permit to sequence and characterize all RNA species bound in vivo by a given RBP.

Background

MicroRNAs (miRNAs) represent a large family of small RNAs that function as regulators of plant and animal gene expression [1, 2]. Plant primary miRNAs transcripts (pri-miRNAs) are synthesized by RNA pol II and have a 5'cap and 3'poly-A tail [3, 4]. Pri-miRNAs form hairpin-like structures and are sequentially processed by RNase III-like proteins, namely DICER-like 1 (DCL1) in *Arabidopsis thaliana*, to generate miRNA precursors (pre-miRNAs) and, ultimately, the mature miRNA/miRNA*

duplex [5, 6]. Plant and animal viruses can interfere with miRNA-mediated regulation in the host at transcriptional or post-transcriptional level [7–14]. Post-transcriptional alterations may include miRNA processing, accumulation and activity. Recent studies revealed that some viral proteins (VP) interfere with pre-miRNA nuclear export and processing by DICER, as is the case of adenovirus [15] and the Ophiovirus *Citrus psorosis virus* (CPsV) [16]. CPsV 24K protein interacts with pre-miR156a and pre-miR171a in *Nicotiana benthamiana* plants, causing a higher accumulation of unprocessed precursor species and a concomitant downregulation of mature miRNA species. Consequently, target transcript

*Correspondence: carinar@biol.unlp.edu.ar
Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, CCT-La Plata,
CONICET - UNLP, calles 47 y 115, 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina

accumulation is upregulated, possibly leading to differential symptom expression [16].

RNA immunoprecipitation (RIP) is a powerful technique used to detect the association of individual proteins with specific RNA molecules *in vivo*. This assay has been successfully employed to purify ribonucleoprotein (RNP) complexes from plant tissue extracts, mostly from *Arabidopsis* [17–20]. RNA-binding proteins (RBP)–RNA associations can be identified in RNP complexes involved in well-conserved core RNA processes, but also in specialized processes regardless of whether the interaction occurs in a specific subcellular location like the nucleus. RIP relies on a simple bead- or resin-based affinity purification step that takes advantage of a specific interaction between an antibody and its antigen. The RIP strategies currently employed fundamentally differ in capturing the native RBP either from the wild-type or the epitope-tagged RBPs from transgenic plants. However, little is known about RIP assays using transiently expressed RBP of heterologous origin such as VP [21]. In the case of miRNA precursors, it is well known that they interact with nuclear RBPs like DCL1 in order to be processed, and that the structural features of these precursors are specifically recognized by processing proteins [22]. In plants, miRNA biogenesis is fast and intermediates are in many cases hardly detected [23]. Therefore, methodologies aimed at detecting specific interactions between RBP of heterologous origin and lowly represented miRNA-processing intermediates need to be optimized.

One of the first steps to be adjusted in a RIP assay is tissue preparation, including plant growth, chemical fixation and extraction conditions. Many RBPs are partitioned within the cell. In VP affecting miRNA processing, RBPs are supposed to be located in the nucleus, normally included in the specialized D-bodies [24–26]. Thus, efficient extraction of nuclear and membrane-associated proteins through specific buffer composition should be performed. The selection of a high-affinity antibody for purification of the targeted RNP is another relevant condition to take into consideration. RIP has been successfully implemented in plants using epitope-tagged proteins expressed in transgenic plants and the corresponding commercially available monoclonal antibodies [17, 19, 27]. In transiently expressed heterologous epitope-tagged proteins, RBP level of expression should be high and must be checked. RIP experiments greatly depend on the differentiation between *in vivo* specific interactions and irrelevant interactions. For instance, an important source of background arises from unspecific interactions of RNPs with the antibody or affinity matrix and therefore RNA binding to co-precipitated proteins leading to false positives. Such background can

be reduced by previous clarification of the lysate with a mock preparation or pre-incubating the matrix with an unspecific protein (such as BSA), and also by using stringent washing conditions. Therefore, suitable negative controls are essential. Negative controls for tagging approaches must include tissue which does not express the tagged-RNP under study and/or a tagged-unspecific protein fused to the amino acid sequence required for the interaction with the matrix. Finally, the last step of adjustment in a RIP assay is monitoring the associated candidate target RNAs with the immunoprecipitated RBP. The most sensitive approach is the use of real-time PCR (RT-qPCR) with specific primers. Careful controls are also required in this step since abundant RNAs will inevitably contaminate the affinity preparation. Quantitative data analysis should also be correctly performed to assess *fold enrichment* of the target RNAs between immunoprecipitated (IP) and *Input* fractions.

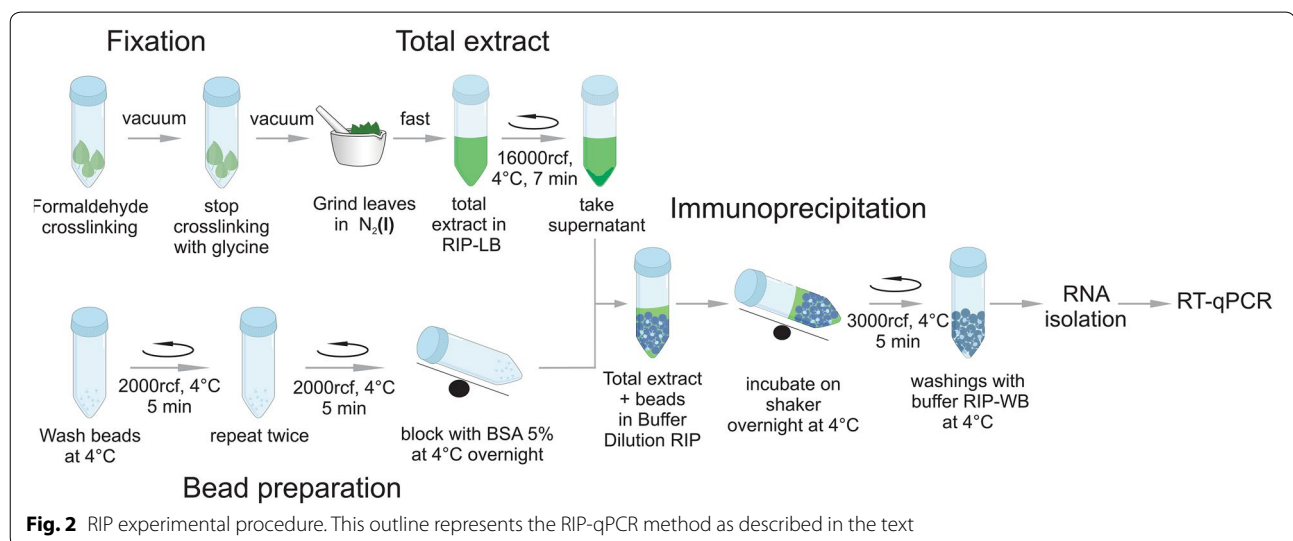
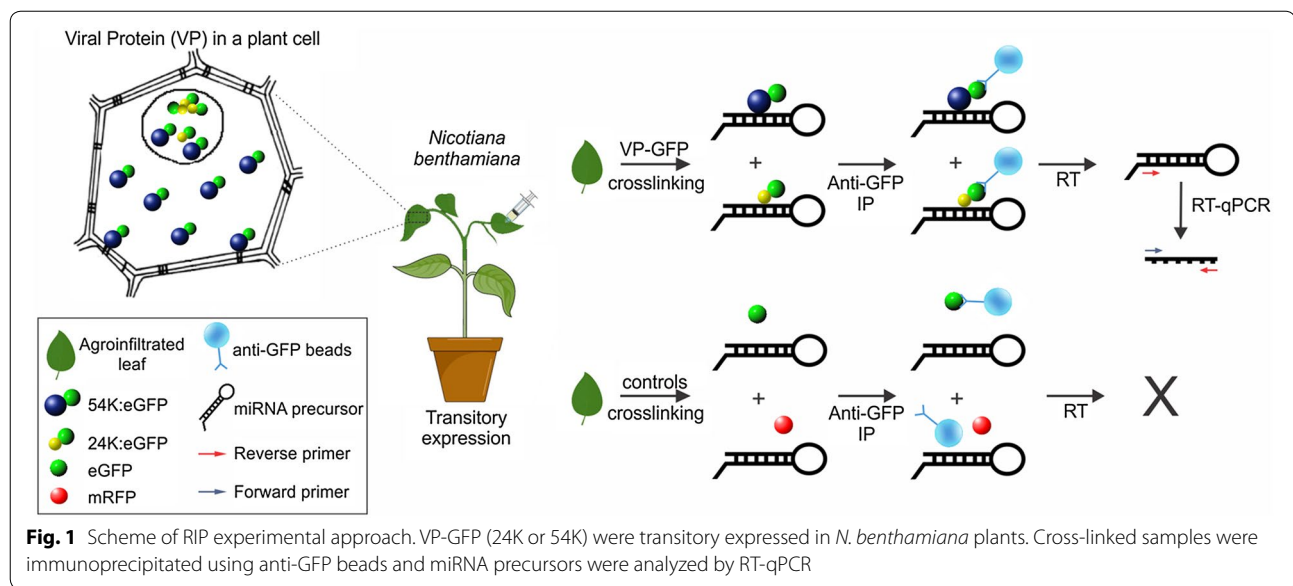
Here we describe a sensitive RIP method modified from Köster and Staiger [19] and applied to nuclear epitope-tagged proteins of heterologous origin transiently expressed in *N. benthamiana*. Moderate levels of transiently expressed VP have shown to accumulate in *N. benthamiana* leaves, as compared with the high accumulation normally detected in natural infection. The present method provides a feasible and promising tool to be applied in experiments with miRNA processing intermediates.

Results and discussion

Modified RIP assay

CPsV 24K and 54K proteins are the viral suppressors of RNA silencing (VSR) and have been shown to present affinity for long synthetic double-stranded RNA molecules [28]. These findings, together with the nuclear localization of both proteins, allow us to propose a role for these proteins in the regulation of pre-miRNA processing and miRNA activity [16]. GFP-fused versions of these two viral proteins (VP) were transiently expressed in *N. benthamiana* plants and the RIP method was adjusted to study the differential accumulation of unprocessed miRNA precursors in tissue expressing VP. Non-fused GFP and RFP were included as controls (Fig. 1).

The RIP method presented here includes a combination of optimized steps (Fig. 2), such as adjusted cross-linking conditions, adequate extraction buffer composition for membrane-bound and partially insoluble proteins, use of a high-quality antibody together with modified immunoprecipitation and elution steps, and inclusion of a highly sensitive RT-qPCR for miRNA precursor detection. A careful selection of negative controls also contributed to the success of the method (Fig. 1).



Cross-linking

The first step to increase the sensitivity and reliability of RIP results was the optimization of cross-linking conditions. In vivo cross-linking stabilizes transient and weak RNA–protein complexes, thus allowing the application of more stringent washing conditions. These washing steps reduce contaminants and eliminate unspecific RBP–RNA interactions that may form after cell lysis [29, 30]. In *Arabidopsis*, chemical cross-linking through formaldehyde fixation has led to an 800-fold enrichment of small spliceosomal U2 snRNA precipitated by spliceosomal U2B protein compared with unfixed seedlings [17]. We first checked the expression of VP-GFP (54K and 24K) and control proteins (GFP and RFP) by fluorescence

visualization under the microscope (Additional file 1: Fig. S1), and then we performed formaldehyde cross-linking of *N. benthamiana* leaves. To ensure that the cross-linking agent penetrated the plant tissue efficiently and displaced gas at the intercellular space, vacuum was applied and released for short periods. Pressure and time intervals were also adjusted.

Extract preparation

The use of rapidly frozen tissue with liquid nitrogen for the preparation of whole cell plant extracts was advantageous for the recovery of intact, uncontaminated RNPs [31]. For instance, RNPs extracted from pulverized frozen leaf tissue were used for the immunoprecipitation of

maize chloroplast polysomes translating specific proteins [32] and for the affinity purification of cytosolic mRNAs in *Arabidopsis* associated with ribosomes [27]. We then quickly harvested and froze *N. benthamiana* leaves transiently expressing VP (54K or 24K) and controls in liquid nitrogen.

The interpretation of RIP data can be helped by an understanding of the spatial distribution of the target RBP. For the case of the CPsV 54K and 24K proteins studied here, nuclear localization has already been described [16, 33]. The chosen buffer needed to stabilize different RNPs, particularly nuclear-bound and membrane-included proteins for immunoprecipitation, is likely to differ. Since 24K protein is difficult to solubilize, special care must be taken in buffer composition to effectively recover it. This step was optimized by the addition of mild detergents to the lysis buffer.

Antibody description and immunoprecipitation conditions

RBP capturing can be performed by a specific antibody directed against its native form or through the expression of an epitope-tagged version of the RBP. The latter allows the recovery of RBP using highly specific and high-affinity commercially available antibodies for the tag. We used the GFP-TRAP[®] system (Chromotek, Germany) that consists of agarose beads containing a covalently linked GFP-binding protein, which is the GFP-recognizing domain of a heavy-chain antibody raised in Camelids [34, 35]. The system is extremely stable (up to 70 °C, functional in 2.0 M NaCl or 0.5% SDS) and has a high binding affinity (dissociation constant in the sub-nanomolar range). Additionally, this experimental approach allows the application of the GFP purification scheme optimized here to a wide array of RBPs.

Interactions of RNPs with the antibody or affinity matrix lead to serious background problems. Besides, differentiation of direct from indirect RNA–protein interactions is hindered by RNA binding to co-precipitated proteins. Unspecific binding can be reduced by pre-blocking the beads with a non-cognate protein. For this reason, we included a pre-incubation step of TRAP[®] beads with BSA. Assays performed without pre-incubation with BSA, showed unspecific interaction of GFP to different RNAs (data not shown). Another consideration is that detergents in the lysis buffer should not exceed 0.2% to avoid unspecific binding to the matrix. Therefore, we diluted the extracted samples in order to keep a low detergent concentration. Washing conditions after immunoprecipitation should also be established carefully to reduce unspecific binding and to avoid the dissociation of specific RNA–protein interactions and RBP–antibody interaction. We then adjusted stringency by including urea (0.5–3 M) in the washing buffer.

Cross-linking reversal and RNA isolation

One of the main advantages of formaldehyde cross-linking is its reversibility, since it allows further characterization of immunoprecipitates. Commonly, samples consisting of the washed beads bound to the RBP–RNA complexes are incubated at 70 °C for 45 min to reverse cross-linking [26, 36]. We optimized this step by lowering the temperature and time of incubation. The new conditions were enough to reverse cross-linking and prevent RNA from prolonged incubation and hydrolysis. RNA was then extracted from these samples using Tri Reagent[®] according to the manufacturer's protocol.

Controls

The use of suitable negative controls is essential for the RIP assay [18]. In the present approach, an aliquot of the cellular lysate was taken before immunoprecipitation (*Input* fraction). This *Input* sample represented the total RNA employed for RIP and served as positive control for the presence of the transcripts under study. Negative controls for immunoprecipitation experiments typically use a unspecific antibody or start with tissues lacking the bait RBP. For tagging approaches, tissue not expressing the tagged isoform is used [19]. We expressed the non-fused GFP driven by identical regulatory elements as in VP–GFP proteins, and both were immunoprecipitated using GFP–TRAP[®]. A comparative analysis of VP–GFP samples or non-fused GFP was then performed by RT–qPCR and VP–GFP was relativized to non-fused samples (see data analysis below). We included RFP immunoprecipitation as an additional negative control of a protein without binding capacity to anti–GFP beads.

Pre-miRNA detection and quantitation

Pre-miRNAs are biogenesis intermediates very relevant for studying variations in miRNA processing, such as those reported in CPsV-infected citrus plants [16]. Northern blot is a gold-standard approach that can detect all sizes, ranging from the long pri-miRNA to the mature form, but limited by its low throughput and low sensitivity. qPCR-based approaches are straightforward for measuring the primary transcript, and they can be adjusted to detect low levels of highly structured miRNA precursors [37, 38]. We set conditions to quantify two conserved miRNA precursors (pre-miR156a and premiR171a) from *N. benthamiana* samples by RT–qPCR and included the well-characterized ubiquitin transcript as internal control [39]. qPCRs were carried out using SYBR–GREEN Master mix (Bio–Rad) and the production of a single PCR product was verified for each primer pair (pre-miR156a, pre-miR171a and ubiquitin) by detecting a single peak in the melting curve.

Data analysis

We calculated *fold enrichment* of each RIP reaction from qPCR data (see formulas below). We processed four samples: VP 24K and 54K and two controls, non-fused GFP and RFP. We first normalized the Ct value of the four IP RNA to the *Input* RNA fractions to eliminate possible differences in RNA sample preparation (ΔCt normalized RIP). Presenting RIP signals as *fold enrichment* of the studied proteins over signals in the non-fused GFP control (unspecific background) would be the most convenient way, accounting also for the specificity of the procedure. Thus, to calculate *fold enrichment*, the normalized RIP fraction value (ΔCt normalized RIP of 24K, 54K or RFP) was first normalized to unspecific background (ΔCt normalized of non-fused GFP sample), obtaining the $\Delta\Delta\text{Ct}$. Finally, the linear conversion of this $\Delta\Delta\text{Ct}$ rendered *fold enrichment*, which was plotted for 24K, 54K and RFP (Fig. 3). *Fold enrichment* of the qPCR internal control, ubiquitin, was also calculated in all samples, and no significant enrichment was observed (Fig. 3).

$$\begin{aligned}\Delta\text{Ct} [\text{Normalized RIP}] &= (\text{Ct} [\text{IP}] - (\text{Ct} [\text{Input}] - \text{Log}_2 (\text{Input/IP dilution factor}))) \\ \Delta\Delta\text{Ct} [\text{RIP/GFP}] &= \Delta\text{Ct} [\text{Normalized RIP}] - \Delta\text{Ct} [\text{Normalized non-fused GFP}] \\ \text{Fold enrichment} &= 2^{(-\Delta\Delta\text{Ct} [\text{RIP/GFP}])}\end{aligned}$$

Protein analysis

Immunoprecipitated proteins were recovered from TriReagent[®] organic phase. The expression, size and integrity of the viral and control proteins were confirmed

by Western blot in the *Input* and IP fractions (Additional file 2: Fig. S2). Silver-stained polyacrylamide gels were also run to check immunoprecipitation progress (Additional file 3: Fig. S3).

Methods

Materials and reagents

Plant growth and infiltration

Nicotiana benthamiana plants were cultivated in pots, under long days conditions (16 h light and 8 h darkness) at 24 °C in growing chambers. They were used to agro-infiltrate when they reached the 4 leaves. *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 carrying VP-GFP, non-fused GFP or RFP constructs were used at OD₆₀₀ between 0.2 and 0.4. Infiltration was performed by pressing a syringe (no needle) containing the cultures on the underside of the leaf. Samples were collected 4 days after infiltration.

Reagents and solutions

Bovine Serum Albumin—BSA (SIGMA-ALDRICH, Cat. No. B2518).

Calcium chloride—CaCl₂ (SIGMA-ALDRICH, Cat. No. C1016).

Dithiothreitol—DTT (SIGMA-ALDRICH, Cat. No. D-9779).

Ethylenediamine tetraacetic acid—EDTA (SERVA, Cat. No. 11278).

Formaldehyde solution (SIGMA-ALDRICH, Cat. No. F8775).

GFP-Trap[®]_A (Chromotek, Alemania. <http://www.chromotek.com/products/nano-traps/gfp-trap/gfp-trap-a/>).

Glycine (SIGMA-ALDRICH, Cat. No. G8898).

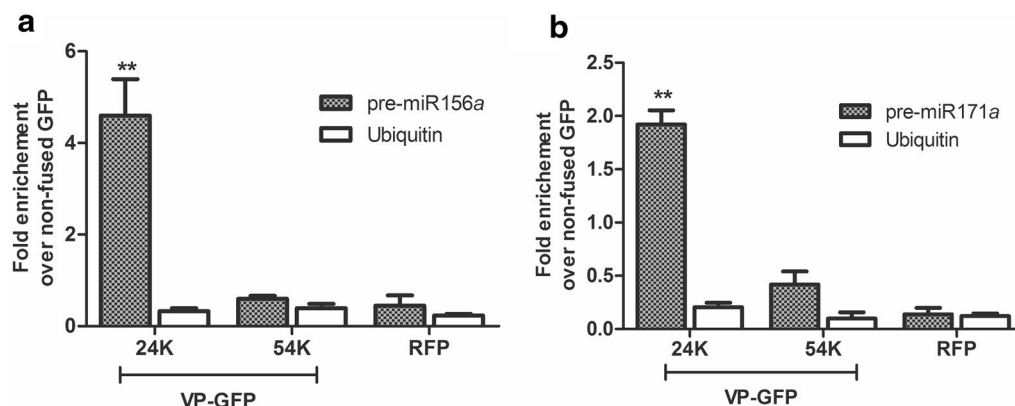


Fig. 3 RIP analysis of precursors associated with 24K or 54K GFP-fused proteins from *Citrus psorosis virus* (CPsV) in *Nicotiana benthamiana*. RT-qPCR was performed to determine the accumulation levels of *N. benthamiana* pre-miR156a (**a**) or pre-miR171a (**b**). *Fold enrichment* of the immunoprecipitated (RIP) precursors was calculated as $2^{(-\Delta\Delta\text{Ct} [\text{RIP/background}])}$. Mean values and standard errors of three independent experiments are shown. Statistical analysis was performed using a two-tailed paired *t* test; * and ** indicate significant differences from RFP control sample at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ values, respectively. *GFP* green fluorescent protein, *RFP* red fluorescent protein

Magnesium chloride-6H₂O—MgCl₂·6H₂O (SERVA, Cat. No. 28305.01).

M-MLV Reverse Transcriptase—MMLV-RT (Promega, Cat. No. M1701).

M-MLV Reverse Transcriptase 5X Reaction Buffer—MMLV buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25 °C), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂ and 10 mM DTT—Promega, Cat. No. M531A).

Phenylmethanesulfonyl fluoride—PMSF (SIGMA-ALDRICH, Cat. No. P7626-1G).

RNase inhibitor—RNasin (Genbiotech, SRL, Cat. No. PE3013).

RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Cat. No. M6101).

RQ1 DNase 10X Reaction Buffer—DNase Buffer (400 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM MgSO₄ and 10 mM CaCl₂—Promega, Cat. No. M198A).

Sodium chloride—NaCl (SERVA, Cat. No. 15585).

Sodium Deoxycholate (SIGMA-ALDRICH, Cat. No. D6750).

Sodium dodecyl sulfate—SDS (SERVA, Cat. No. 151-21-3).

Stop Solution: 20 mM EGTA (pH 8.0) (Promega, Cat. No. M199A).

SYBR-GREEN Master mix (Bio-Rad, Cat. No. 1708882).

TRI-Reagent® (Molecular Research Center, Inc.).

Tris [hydroxymethyl]aminomethane (SIGMA-ALDRICH, Cat. No. T-1378).

Triton X-100 (SERVA, Cat. No. 37240).

Urea (SERVA, Cat. No. 24524).

RIP Lysis Buffer (RIP-LB): 20 mM Tris-HCl (pH = 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.1% SDS, 1% Sodium Deoxycholate, 1% Triton X-100. Before using add: 5 mM PMSF and 5 mM DTT.

RIP Washing Buffer (RIP-WB): 50 mM Tris-HCl (pH = 7.5), 500 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, 0.5% Sodium Deoxycholate, 0.1% SDS, 2 M Urea. Before using add 2 mM DTT.

RIP dilution Buffer (RIP-DB): 10 mM Tris-HCl (pH = 7.5), 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA.

RIP Procedure

Day 1

Preparation of GFP-TRAP

[Note: keep tubes on ice during all processing]

Washes:

1. Wash 30 µl of GFP-TRAP with 1 ml of cold RIP-LB for 5 min at 4 °C.
2. Centrifuge 5 min at 2000 rcf at 4 °C. Remove supernatant.
3. Repeat washing twice.

[Note: be aware that beads precipitate (white pellet) when spinning, if not repeat the spin].

Blocking:

1. Add 500 µl of RIP-LB + BSA 5% to the beads.
2. Incubate overnight in shaker at 4 °C.
3. At the time of use, centrifuge for 3 min at 2000 rcf at 4 °C. Remove supernatant.

Day 2

Fixation

1. Place five agroinfiltrated *N. benthamiana* leaves* in a 15 ml tube.
2. Add 10 ml of 1% formaldehyde (liquid level should cover the leaves).
3. Apply vacuum with pump, 60–64 cmHg for 15 min (5 times of 3 min).
[Note: check that all leaves have absorbed the liquid].
4. Discard formaldehyde and replace it with 10 ml of 125 mM glycine.
5. Apply vacuum with pump, 60–64 cmHg for 15 min (5 times of 3 min).
6. Remove the solution.
7. Wash the leaves 4 times with RNase-free water at 4 °C.
8. Remove the liquid. Blot the leaves carefully on absorbent paper.

*VP-GFP, non-fused GFP or RFP expression was previously checked by fluorescent microscopy using a *Nikon eclipse e200* microscope with a 40× objective and EN/GFP 41017 and G2-A filters for GFP and RFP respectively. Images were processed with ImageJ software.

Preparation of total extract

1. Add 500 µl of RIP-LB in a 1.5 ml tube and place on ice. Add 50 U/tube of RNase inhibitor.
2. Grind 5 leaves in liquid nitrogen to fine powder. Add 0.5 g of extract to each tube containing RIP-LB.
3. Vortex 15 min at 4 °C.
4. Incubate for 10 min on ice.
5. Centrifuge 7 min at 16000 rcf at 4 °C.
6. Transfer the supernatant to a new tube. Spin again.

[Note: this step is repeated once again in order to obtain a clearer supernatant].

Immunoprecipitation

1. Add to the washed beads (in order): 550 µl of RIP-DB, 50 µl of the total extract supernatant and 40 U of RNase inhibitor.

2. **INPUT CONTROL:** Add to a new 1.5 ml tube: 550 μ l of RIP-DB and 50 μ l of the total extract supernatant and 40 U of RNase inhibitor.
3. Incubate both groups of tubes overnight at 4 °C with softly shaking.

Day 3

1. Centrifuge tubes with beads 5 min at 3000 rcf and 4 °C.
2. Take the supernatant. Freeze rapidly in liquid nitrogen and store at -80 °C.
3. Add 1 ml of RIP-WB at 4 °C to the beads.
4. Centrifuge 5 min at 3000 rcf and 4 °C. Remove the supernatant carefully and discard.
[Note: beads are observed as a little defined white precipitate. Repeat centrifugation may be necessary].
5. Repeat washing 4 more times.
6. Finally, wash with 1 ml of cold RIP-LB.
7. Centrifuge 5 min at 3000 rcf and 4 °C. Discard the supernatant.

Isolation of RNA

1. Add 400 μ l of TRI-Reagent® to the tubes with the beads and to the **INPUT CONTROL**.
2. Vortex 15 s.
3. Incubate 5 min at 55 °C. Mix the tubes with your hand every 30 s.
4. Add 100 μ l of chloroform.
5. Continue procedure as described by de manufacturer.
6. Resuspend the *Input* pellets in 20 μ l of RNase-free water and the immunoprecipitate pellets in 8 μ l of RNase-free water.

[Note: RNA may be in very low concentration in the immunoprecipitate pellets. It is convenient not to measure it. In the case of *Inputs* the RNA concentration was estimated from the absorbance quantification at 260 nm measured in a *ND-1000 Spectrophotometer* (NanoDrop Technologies, Inc.)].

DNase treatment

1. Take the 8 μ l of the immunoprecipitate fraction and 2 μ g of the *Inputs*.
2. Add 1 μ l DNase Buffer and 1 μ l RQ1 RNase-Free DNase. Add RNase-free water to a final volume of 10 μ l. Incubate at 37 °C for 30 min.
3. Add 1 μ l of Stop Solution. Incubate at 65 °C for 10 min.

Reverse transcription

1. Take 4 μ l of the sample treated with DNase. Add 0.64 μ l of the reverse primer (100 mM) and 9.06 μ l of RNase-free water. Incubate at 80 °C for 5 min. Quickly put in ice-water for 5–10 min.
2. Incubate for 5 min at 60 °C.
3. Add 5 μ l of MMLV buffer, 5 μ l dNTPs, 0.3 μ l RNase inhibitor and 1 μ l MMLV-RT. The final reaction volume was 25 μ l. Incubate at 42 °C for 60 min and then 15 min at 70 °C.

RT-qPCR analysis

For RT-qPCR analysis of pre-miR156a and pre-miR171a, we synthesized first-strand cDNA using MMLV from total DNase-treated RNA. Specific primers [pre156aF 5'-TGACAGAAGAGAGTGAGCAC-3' pre156aR and 5'-GCTGACAGAAAGAGCAGTGA-3' for pre-miR156a, and NB.pre171aF 5'-TATTGGTGCGGTTCAATGAGA-3' and NB.pre171aR 5'-GGCACGGCTCAATCAAAAAG-3' for pre-miR171a] were used. cDNA was then used as a template for qPCRs. qPCR was performed with an iCycler iQ (Bio-Rad) and SYBR-GREEN Master mix (Bio-Rad) in a reaction held at 95 °C for 10 min, then 44 cycles of 20 s at 95 °C, 30 s at 48 °C and 20 s at 72 °C, followed by melting curve. The presence of a unique product of the expected size was verified on ethidium bromide-stained agarose gels. The absence of contaminant genomic DNA was confirmed in reactions with DNase-treated RNA as the template. *N. benthamiana* ubiquitin amplification was used to normalize the amount of template cDNA. For this, the primers used were NB.UBQF 5'-ATCCACCCGACCAGCAGAG-3' and NB.UBQR 5'-TAGAAACCACCACGGAGACG-3'. Three independent experiments and three biological replicates per experiment were performed. The reproducibility of the assay was monitored by running technical triplicates. Data analysis was performed as described above.

Protein analysis

VP-GFP, GFP and RFP in *Input* and IP fractions were detected by Western blot with anti-GFP JL-8 monoclonal antibody (BD Biosciences Clontech, USA) and anti-mRFP 3F5 monoclonal antibody, respectively (Chromotek, Germany). Horseradish Peroxidase conjugated anti-mouse (Bio-Rad, USA) was used as secondary antibody. Silver-stained polyacrylamide gels (10%) were run of *Input* and IP fractions as previously described [40]. Protein sizes were estimated using the ECL™ Rainbow™ Marker Full-range protein ladder 12–225 kDa (Amersham™). Different exposure times were taken according to the protein accumulation.

Additional files

Additional file 1: Fig. S1. Fluorescent microscopy of VP 24K (**a**), 54K (**b**) and controls GFP (**c**) and RFP (**d**). Nuclear and cytoplasmic localization of the proteins at 3 days post-agroinfiltration in *Nicotiana benthamiana* epidermal cells. Left bottom insets show a detail of the nuclear localizations. Scale bar, 10 μ m.

Additional file 2: Fig. S2. Western blot analysis of transiently expressed 24K or 54K in *Nicotiana benthamiana* plants before (*Input*) and after (IP) RNA immunoprecipitation. The two fractions were analyzed using anti-green fluorescent protein (α -GFP) antibodies for the GFP-fused viral proteins (left panels) or anti-red fluorescent protein (α -RFP) antibodies for the RFP control (right panels). Different exposure times are indicated under IP panels. Coomassie blue-stained sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) is shown in the lower panel of the *Input* fraction as a loading control.

Additional file 3: Fig. S3. Silver-stained SDS-PAGE analysis in *Inputs* and RNA immunoprecipitation (IP). **a** Black arrow indicates GFP. Amounts loaded for *Input* and IP correspond to 10 and 20 mg of the initial tissue respectively. Asterisks indicate artifact signal from the staining. **b** White arrow indicates 24K-GFP fusion (24K) and white dash indicated free GFP. Amount loaded for *Input* and IP corresponds to 10 mg of the initial tissue. *INPUT* (2) corresponds to a shorter time of staining respect to *INPUT* (1).

Authors' contributions

FEM and CAR designed the protocol described. FEM performed all the experiments and FEM, MLG and CAR analyzed the data. CAR wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank Dr. Ariel A. Bazzini and Dr. Eduardo J Peña for critical reading of the manuscript. We also thank Tec. Agr. Claudio Mazo (IBBM, CCT-La Plata-CONICET-UNLP) for providing *N. benthamiana* plants.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Funding

This work was supported by grants from Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica, Argentina (PICT-2014-1007 and PICT Start Up-2014-3762).

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Received: 29 June 2017 Accepted: 15 January 2018

Published online: 31 January 2018

References

- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116:281–97.
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol*. 2006;57:19–53.
- Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K, He Z, Sontheimer EJ, Carthew RW. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*. 2004;117:69–81.
- Xie Z, Allen E, Fahlgren N, Calamar A, Givan SA, Carrington JC. Expression of Arabidopsis MIRNA genes. *Plant Physiol*. 2005;138:2145–54.
- Kurihara Y, Watanabe Y. Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:12753–8.
- Park W, Li J, Song R, Messing J, Chen X. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in Arabidopsis thaliana. *Curr Biol*. 2002;12:1484–95.
- Cazalla D, Steitz JA. Down-regulation of a host microRNA by a viral non-coding RNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2010;75:321–4.
- Bazzini AA, Hopp HE, Beachy RN, Asurmendi S. Infection and coaccumulation of tobacco mosaic virus proteins alter microRNA levels, correlating with symptom and plant development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:12157–62.
- Bazzini AA, Almasia NI, Manacorda CA, Mongelli VC, Conti G, Maroniche GA, Rodriguez MC, Distefano AJ, Hopp HE, del Vas M, Asurmendi S. Virus infection elevates transcriptional activity of miR164a promoter in plants. *BMC Plant Biol*. 2009;9:152.
- Chapman EJ, Prokhnovsky AI, Gopinath K, Dolja VV, Carrington JC. Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev*. 2004;18:1179–86.
- Chen J, Li WX, Xie D, Peng JR, Ding SW. Viral virulence protein suppresses RNA silencing-mediated defense but upregulates the role of microRNA in host gene expression. *Plant Cell*. 2004;16:1302–13.
- Kasschau KD, Xie Z, Allen E, Llave C, Chapman EJ, Krizan KA, Carrington JC. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Dev Cell*. 2003;4:205–17.
- Pfeffer S, Voinnet O. Viruses, microRNAs and cancer. *Oncogene*. 2006;25:6211–9.
- Silhavy D, Burgyn J. Effects and side-effects of viral RNA silencing suppressors on short RNAs. *Trends Plant Sci*. 2004;9:76–83.
- Lu S, Cullen BR. Adenovirus VA1 noncoding RNA can inhibit small interfering RNA and MicroRNA biogenesis. *J Virol*. 2004;78:12868–76.
- Reyes CA, Ocolotobiche EE, Marmisolle FE, Robles Luna G, Borniego MB, Bazzini AA, Asurmendi S, García ML. Citrus psorosis virus 24 K protein interacts with citrus miRNA precursors, affects their processing and subsequent miRNA accumulation and target expression. *Mol Plant Pathol*. 2016;17:317–29.
- Terzi LC, Simpson GG. Arabidopsis RNA immunoprecipitation. *Plant J*. 2009;59:163–8.
- Barkan A. Genome-wide analysis of RNA-protein interactions in plants. *Methods Mol Biol*. 2009;553:13–37.
- Koster T, Staiger D. RNA-binding protein immunoprecipitation from whole-cell extracts. *Methods Mol Biol*. 2014;1062:679–95.
- Sorenson R, Bailey-Serres J. Rapid immunoprecipitation of ribonucleoprotein complexes of plants. *Methods Mol Biol*. 2015;1284:209–19.
- Shen WX, Au PCK, Shi BJ, Smith NA, Dennis ES, Guo HS, Zhou CY, Wang MB. Satellite RNAs interfere with the function of viral RNA silencing suppressors. *Front Plant Sci*. 2015;6:281.
- Bologna NG, Schapire AL, Zhai J, Chorostecki U, Boisbouvier J, Meyers BC, Palatnik JF. Multiple RNA recognition patterns during microRNA biogenesis in plants. *Genome Res*. 2013;23:1675–89.
- Bologna NG, Mateos JL, Bresso EG, Palatnik JF. A loop-to-base processing mechanism underlies the biogenesis of plant microRNAs miR319 and miR159. *EMBO J*. 2009;28:3646–56.
- Fang Y, Spector DL. Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living Arabidopsis plants. *Curr Biol*. 2007;17:818–23.
- Fujioka Y, Utsumi M, Ohba Y, Watanabe Y. Location of a possible miRNA processing site in SmD3/SmB nuclear bodies in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol*. 2007;48:1243–53.
- Song L, Han MH, Lesicka J, Fedoroff N. Arabidopsis primary microRNA processing proteins HYL1 and DCL1 define a nuclear body distinct from the Cajal body. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104:5437–42.
- Zanetti ME, Chang IF, Gong F, Galbraith DW, Bailey-Serres J. Immunoprecipitation of polyribosomal complexes of Arabidopsis for global analysis of gene expression. *Plant Physiol*. 2005;138:624–35.
- Robles Luna G, Reyes CA, Peña EJ, Ocolotobiche EE, Baeza C, Borniego MB, Kormelink R, García ML. Identification and characterization of two RNA silencing suppressors encoded by ophiioviruses. *Virus Res*. 2017;235:96–105.
- Mili S, Steitz JA. Evidence for reassociation of RNA-binding proteins after cell lysis: implications for the interpretation of immunoprecipitation analyses. *RNA*. 2004;10:1692–4.
- Ule J, Jensen K, Mele A, Darnell RB. CLIP: a method for identifying protein-RNA interaction sites in living cells. *Methods*. 2005;37:376–86.

31. Oeffinger M, Wei KE, Rogers R, DeGrasse JA, Chait BT, Aitchison JD, Rout MP. Comprehensive analysis of diverse ribonucleoprotein complexes. *Nat Methods*. 2007;4:951–6.
32. Barkan A. Proteins encoded by a complex chloroplast transcription unit are each translated from both monocistronic and polycistronic mRNAs. *EMBO J*. 1988;7:2637–44.
33. Robles Luna G, Pena EJ, Borniego MB, Heinlein M, García ML. Ophioviruses CPsV and MiLBVV movement protein is encoded in RNA 2 and interacts with the coat protein. *Virology*. 2013;441:152–61.
34. Rothbauer U, Zolghadr K, Tillib S, Nowak D, Schermelleh L, Gahl A, Backmann N, Conrath K, Muyldermans S, Cardoso MC, Leonhardt H. Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nat Methods*. 2006;3:887–9.
35. Rothbauer U, Zolghadr K, Muyldermans S, Schepers A, Cardoso MC, Leonhardt H. A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins. *Mol Cell Proteomics*. 2008;7:282–9.
36. Niranjankumari S, Lasda E, Brazas R, Garcia-Blanco MA. Reversible cross-linking combined with immunoprecipitation to study RNA-protein interactions in vivo. *Methods*. 2002;26:182–90.
37. Schmittgen TD, Jiang J, Liu Q, Yang L. A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors. *Nucleic Acids Res*. 2004;32:e43.
38. Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet*. 2012;13:358–69.
39. Boava LP, Cristofani-Yaly M, Mafra VS, Kubo K, Kishi LT, Takita MA, Ribeiro-Alves M, Machado MA. Global gene expression of *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki* and their hybrids under infection of *Phytophthora parasitica*. *BMC Genom*. 2011;12:39.
40. Blum H, Beier H, Gross JH. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. 1987;8:93–9.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit





Up-regulation of microRNA targets correlates with symptom severity in *Citrus sinensis* plants infected with two different isolates of citrus psorosis virus

Facundo E. Marmisolle¹ · Ailín Arizmendi¹ · Andrés Ribone² · Máximo Rivarola² · María L. García¹ · Carina A. Reyes¹

Received: 22 July 2019 / Accepted: 11 October 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Main conclusion miRNA targets from *Citrus sinensis* are predicted and validated using degradome data. They show an up-regulation upon infection with CPsV, with a positive correlation between target expression and symptom severity.

Abstract Sweet orange (*Citrus sinensis*) may suffer from disease symptoms induced by virus infections, thus resulting in drastic economic losses. Infection of sweet orange plants with two isolates of citrus psorosis virus (CPsV), expressing different symptomatologies, alters the accumulation of a set of endogenous microRNAs (miRNAs). Here, we predicted ten putative targets from four down-regulated miRNAs: three belonging to the CCAAT-binding transcription factor family (CBFs); an *Ethylene-responsive transcription factor* (RAP2-7); an *Integrase-type DNA-binding superfamily protein* (AP2B); *Transport inhibitor response 1* (TIR1); *GRR1-like protein 1-related* (GRR1); *Argonaute 2-related* (AGO2), *Argonaute 7* (AGO7), and a long non-coding RNA (ncRNA). We validated six of them through analysis of leaf degradome data. Expressions of the validated targets increase in infected samples compared to healthy tissue, showing a more striking up-regulation those samples with higher symptom severity. This study contributes to the understanding of the miRNA-mediated regulation of important transcripts in *Citrus sinensis* through target validation and shed light in the manner a virus can alter host regulatory mechanisms leading to symptom expression.

Keywords CPsV · Degradome analysis · MicroRNAs · Sweet orange · Targets

Abbreviations

AGO2	<i>Argonaute 2-related</i>
AGO7	<i>Argonaute 7</i>
AP2B	<i>Integrase-type DNA-binding superfamily protein</i>
CBF	<i>CCAAT-binding transcription factor</i>
CPsV	Citrus psorosis virus
GRR1	<i>GRR1-like protein 1-related</i>

ncRNA	Non-coding RNA
RAP2-7	<i>Ethylene-responsive transcription factor</i>
Targets	Targeting specific transcript RNAs
TIR1	<i>Transport inhibitor response 1</i>

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00425-019-03294-0>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Carina A. Reyes
carinar@biol.unlp.edu.ar

¹ Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, CCT-La Plata, CONICET-UNLP, Calles 47 y 115, 1900 La Plata, Buenos Aires, Argentina

² IABiMo, Conicet-INTA, CICVyA-INTA, Hurlingham, Buenos Aires, Argentina

Introduction

Plant pathogens are a major constraint to agriculture and threaten crop yield and global food security (Dodds and Rathjen 2010; Dangl et al. 2013). Among diverse plant pathogens, viruses are obligate intracellular organisms that depend on the host cell for basic machinery to complete their life cycle (Wang 2015).

Psorosis is a graft-transmissible and widespread disease, affecting most citrus varieties worldwide, particularly those in North and South America and in the Mediterranean basin (Roistacher 1993). In Argentina, psorosis is one of the most important indexed diseases in certification programs (Gómez 2019) and its natural diffusion is a threat to citrus

plants (Danós 1990; Zaneke et al. 2006). Citrus psorosis virus (CPsV), the type member of the Aspiviridae family (formerly Ophioviridae), genus *Ophiovirus* (García et al. 2017), is a three-partite, non-enveloped, negative-sense, single-stranded RNA (ssRNA) virus. RNA 1 encodes a 280-kDa replicase (RdRp) (Naum-Ongania et al. 2003) as well as a 24-kDa protein that affects miRNA maturation (Reyes et al. 2016) and has RNA silencing suppressing activity (Robles Luna et al. 2017). RNA 2 encodes a 54 kDa aspartil protease involved in virus movement (Robles Luna et al. 2013, 2018; Borniego et al. 2016) and has RNA silencing suppressing activity as well (Robles Luna et al. 2017). RNA 3 encodes the coat protein (CP) of 48 kDa (Peña et al. 2012). Typical CPsV symptoms in adult trees include bark scaling, pustules and gum accumulation on the trunk, flecking, chlorotic spots, and necrotic shock of young shoots. Molecular-level studies of the mechanism of this symptomatology may help elucidate the disease process and CPsV–citrus interactions.

miRNAs are a large group of small endogenous non-coding RNA molecules of 20–24 nucleotides in length that post-transcriptionally regulate eukaryotic gene expression by targeting specific transcript RNAs (targets) for cleavage or translational inhibition (Bartel 2004; Voinnet 2009). They play important roles in regulating the expression of many genes involved in plant development and cell differentiation, proliferation, signal transduction, response to environmental stress, and pathogen invasion, among others (Jones-Rhoades et al. 2006; Khraiweh et al. 2012; Jin et al. 2013). Plant viruses often interfere with endogenous miRNAs pathways, which can result in disease symptoms, such as chlorosis, dwarfing, and abnormal growth. Numerous cases of altered host miRNA expression in response to plant virus infection have been documented including *Arabidopsis thaliana* infected with tobacco mosaic virus (TMV) (Bazzini et al. 2007), tomatoes plants infected with cucumber mosaic virus (CMV) and TMV (Chen et al. 2012), rice stripe virus (RSV) infecting rice (Du et al. 2011; Tong et al. 2017), and grapevine vein clearing virus (GVCV) infecting grapevine (Singh et al. 2012).

To assess and define a putative function for a miRNA in plants, a further step of target identification is necessary. miRNA-target genes can be related to different biological processes. Zhang et al. (2012) classified miRNA targets from *Poncirus trifoliata* into 11 gene ontology categories being the most frequent metabolic processes, cellular processes, response to stimulus, developmental processes, localization, and biological regulations. These findings suggest that citrus miRNAs are involved in a broad range of physiological functions. In citrus, previous studies demonstrated that most of the identified and validated conserved targets were members of different families of transcription factors. SPL and AP2 are targeted by miR156 and miR172, respectively (Song et al. 2010a, b; Wu et al. 2010), and have regulatory

functions in juvenile/adult development stages, abiotic stress responses, symptom expression, and defence (Klein et al. 1996; Cardon et al. 1997, 1999; Padmanabhan et al. 2013; Cui et al. 2014). Auxin response factors (ARFs), involved in signal transduction, are regulated by miR167 in citrus plants (Zhang et al. 2012). However, most annotations of citrus miRNAs and their targets are derived from computational predictions and have not yet been validated.

In a previous work, we analysed the accumulation of several conserved mature miRNAs and miRNA processing intermediates in citrus plants infected with two distantly related CPsV isolates that induce symptoms of different severity (Reyes et al. 2016). We showed that these isolates alter the accumulation of a set of endogenous miRNAs through impeding the processing of miRNA precursors. The aim of the present work has been to predict targets of the miRNAs altered in CPsV-infected tissue and to validate them through analysis of published degradome data. Levels of the predicted target transcripts were assessed in CPsV-infected samples compared to healthy ones and a positive correlation between expression of validated targets and symptom severity was established.

Materials and methods

Plant citrus material and CPsV isolates

CPsV isolates used in this study were the Argentine CPsV 90-1-1 (INTA, Concordia, Argentina) (García et al. 1993) and CPV4 from Florida (USA) (Garnsey and Timmer 1980), but probably of Texas origin (Garnsey et al. 1976). Pineapple sweet orange plants [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], provided by Laboratorio de Protección Vegetal y Biotecnología, INTA-Concordia, Argentina, were infected by graft inoculation in the stem, using a small chip taken from infected bark and healthy tissue (Roistacher 1991). Tissue of *Citrus sinensis* infected with both CPsV isolates and healthy samples were collected before the shock reaction showed complete necrosis. Equivalent material from healthy plants and expressing flecking symptoms were collected.

RNA isolation and cDNA preparation

Total RNA was isolated using TriReagent® (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) following the manufacturer's instructions, starting from 50 to 200 mg of tissue, previously ground in liquid N₂. RNA integrity was assayed by 1% agarose gel electrophoresis. Total RNA (4 µg) was processed with RQ1 RNase-free DNase (Promega) for 60 min at 37 °C to eliminate potential DNA contamination. The final volume was 15 µl. Then, 5 µl of this treatment was used to prepare cDNA using M-MLV reverse transcriptase

(Promega) with oligodT primers (Biodynamics) and Native RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega) in a final volume of 15 µl.

Target detection by reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Target transcripts were analysed by RT-qPCR. A 1:6 dilution of the cDNA was used as template for qPCR reactions. The absence of contaminant genomic DNA was confirmed by PCR with DNase-treated RNA as the template. qPCR were performed with an qTOWER 2.0 (Analytik Jena AG) and 5X HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix (Rox) (Solis BioDyne) following the manufacturer's instructions in a reaction held at 95 °C for 10 min, then 60 cycles of 20 s at 95 °C, 30 s at 51–52 °C and 20 s at 72 °C, followed by melting curve 60–95 °C 6 s with ΔT 1 °C. Primer sequences are indicated in Table S1. The presence of a unique product of the expected size was verified on ethidium bromide-stained agarose gels. Actin (Cs6g06250) and ubiquitin (Cs6g04450) amplification were used as internal controls (Boava et al. 2011). All RT-qPCR experiments were performed using at least three biological and three technical replicates. Primers for *Citrus sinensis* target and reference genes detection were designed using citrus sequences deposited in Phytozome v12 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) and in the *Citrus sinensis* annotation Project (<http://citrus.hzau.edu.cn/orange/>).

Statistical analysis

The geometric Ct mean of two reference genes (actin and ubiquitin) and efficiency average were employed for normalization of the RT-qPCR data. The relative expression was expressed as $E^{-\Delta Ct_{target}}/E^{-\Delta Ct_{housekeeping}}$, where E corresponds to primer efficiency value. Analysis of variance (ANOVA) with a significance level of 5.0% ($P < 0.05$) followed by Tukey's test was used for comparison of means. Means with a common letter are not significantly different ($P > 0.05$). Prior to every parametric analysis, the assumptions of normality and homogeneity of variance were checked.

Prediction of target transcripts

To predict potential target genes of *Citrus sinensis*-encoded miRNA, we used two online tools: comTAR (<http://rnabio.ibr-conicet.gov.ar/comtar>; Chorostecki and Palatnik 2014) and psRNATarget (<http://plantgrn.noble.org/psRNA-Target>; Dai and Zhao 2011).

We used comTAR for miR169, miR172, and miR393 target predictions. Settings for the search: (i) 10 as the minimum number of species, where the same tag is present for a

particular miRNA. This is the most restrictive condition to search in comTAR; (ii) a minimum free energy hybridization cutoff of 72PE; and (iii) only one mismatch allowed between positions 1 and 11 of the miRNA consensus sequence. The chosen targets predicted had two mismatches as maximum.

We used psRNATarget tool to search possible targets for the evolutionarily young miR403. Mature miR403 sequence used was: TTAGATTACGCACAACTCG, obtained using miRBase database (<http://www.mirbase.org>; csi-miR403 MIMAT0018471). The library chosen for the prediction was: *Citrus sinensis* (sweet orange group), transcript, JGI genomic project, Phytozome 11, 154 v1.1. Settings for the search: (i) region in which server will score complementarity between miRNA and target mRNA of 19 nt in length; (ii) 5 as maximum cutoff of score based on given scoring schema; (iii) only two mismatches allowed in the complementary region corresponding to nucleotide positions 2–13 from 5' end of the miRNA (seed region); (iv) 1.5 extra penalty weight for mismatches in seed region; (v) consideration of non-canonical pairs as mismatches; (vi) half mismatch score for G:U pair and 1 as the penalty for other mismatches; and (vii) gaps were allowed and the penalty for extending an existent gap was 0.5. The predicted targets were removed if the mismatch score was greater than the threshold. Using this tool, we selected a putative ncRNA (orange1.1t01710) target for miR403.

Both AGO2 and AGO7 were obtained by comparing sequences with AGO2 (At1g31280) from *Arabidopsis thaliana* using Phytozome Blast, which had previously been reported as target of miR403 (Allen et al. 2005). In these cases, we allowed the presence of more than two mismatches between miRNA and target.

Ontology analysis was performed using InterProScan (EMBL-EBI; <https://www.ebi.ac.uk/interpro/interproscan.html>; Jones et al. 2014). We searched domains for the predicted targets using peptide sequences provide in the *Citrus sinensis* annotation Project (<http://citrus.hzau.edu.cn/orange/>).

Degradome analysis

To perform a full degradome analysis we locally installed and ran the CleaveLand4 pipeline using the genome of sweet orange (*Citrus sinensis*, URL: <http://citrus.hzau.edu.cn/orange/download/csi.chromosome.fa.tar.gz>; Xu et al. 2013) and the data from Liu et al. (2014) (Input fastq data sets utilized were: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE46765> and <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE18207>). We then used the following miRNAs from miRBase (<http://www.mirbase.org>) to be tested: miR169, miR172, miR393 and miR403.

CleaveLand4 first predicts slicing sites on targets mRNAs for the query miRNAs. Then, the program ranks the putative

degradome events based on the abundance of cleaved tag reads aligned near to the putative cleaving sites on the target transcript. The program considers five categories: Category 0:> 1 read, equal to the maximum on the transcript, when there is just 1 position at the maximum value. Category 1:> 1 read, equal to the maximum on the transcript, when there is > 1 position at maximum value. Category 2:> 1 read, above the average depth, but not the maximum on the transcript. Category 3:> 1 read, but below or equal to the average coverage depth (without zeros) on the transcript. Category 4: just one read at that position.

The CleaveLand4 pipeline was run with default settings, using GSTAr.pl (Addo-Quaye et al. 2009) for slicing site prediction and Bowtie (Langmead 2010) for read alignment. We selected matches with $P < 0.05$ and degradome categories 0–2.

Results

Bioinformatic prediction of *Citrus sinensis* miRNA targets

We previously analysed the accumulation of ten conserved miRNAs. A group of them was down-regulated in at least one of the infected samples (flecking CPV4, flecking or shock 90-1-1) compared to healthy samples. For the three most drastically altered miRNAs (miR156, miR167, and miR171), we also analysed their validated targets [*Squamosa promoter-binding protein-like* (SPL) 9 and 13, *Auxin response factor* (ARF) 6 and 8 and *Scarecrow-like 6* (SCL6)], respectively (Reyes et al. 2016). The expected negative correlation between miRNA accumulation and target transcripts was observed when infected plants and healthy controls were compared (Reyes et al. 2016). To assess the accumulation of the non-validated targets from the remaining four down-regulated miRNAs (Table 1) during CPsV infection, we first predicted them using comTAR (<http://rnabiology.ibr-conicet.gov.ar/comtar>; Chorostecki and Palatnik 2014) and psRNATarget from PlantGRN (A Plant Small RNA Target Analysis Server; <http://plantgrn.noble.org/psRNATarget>; Dai and Zhao 2011). comTAR searches for targets using a series of pre-computed conserved miRNAs and focuses the prediction on the evolutionary conservation of the potential regulation in different species. Using this tool, we retrieved potential targets for three of the four analysed miRNAs: miR169, miR172, and miR393. For the case of the miR403, we used psRNATarget, because this tool enables targets search for evolutionarily young miRNAs (as miR403). psRNATarget allows the uploading of miRNA sequences and the selection of a cDNA library. In this way, we predicted 10 putative targets from the four analysed miRNAs: *CCAAT-binding transcription*

Table 1 Accumulation of endogenous miRNAs in *Citrus sinensis* plants infected with citrus psorosis virus (CPsV) 90-1-1 or CPV4 isolate (Reyes et al. 2016)

microRNA	Flecking 90-1-1	Shock 90-1-1	Flecking CPV-4
miR156	– 1.22**	– 1.51**	– 0.6**
miR164	0.17	0.84	– 0.17
miR166	0.22	0.33	– 0.12
miR167	– 1.13**	– 1.12**	– 1.01**
miR169	– 0.77**	– 0.40*	– 0.54**
miR171	– 1.06**	– 1.17**	– 0.98**
miR172	– 0.53	0.02	– 0.22
miR390	0.19	– 0.08	0.12
miR393	– 0.36	– 0.38	– 0.18
miR403	– 0.88**	– 0.55*	– 0.18

Relative accumulation of miRNA compared with healthy leaves (mean values and standard error of miRNA level of three independent experiments). Bold lettering indicates down-regulated miRNAs that were selected for target assessment. The numbers were calculated as log2 of the infected/healthy sample ratios. Differences between two groups were tested with a one-way ANOVA (Tukey post hoc test)

* and ** indicate $P < 0.05$ and $P < 0.01$ values, respectively, in comparison with the healthy group

factor subunit B (Nuclear factor Y, subunit A1 (CBFA1), subunit A3 (CBFA3) and subunit A10 (CBFA10), (predicted targets of miR169); *Ethylene-responsive transcription factor* (RAP2-7) and *Integrase-type DNA-binding superfamily protein* (AP2B), (predicted targets of miR172); *Transport inhibitor response 1* (TIR1) and *GRR1-like protein 1-related* (GRR1), (predicted targets of miR393); *Argonaute 2-related* (AGO2), *Argonaute 7* (AGO7) and a putative ncRNA (predicted targets of miR403) (Fig. 1). The functions of target genes were then assigned using Gene Ontology from InterProScan (EMBL-EBI; <https://www.ebi.ac.uk/interpro/interproscan.html>; Jones et al. 2014, see GO columns in Table 2). The analysis reveals that *Citrus sinensis* CBFA, RAP2-7, and AP2B factors have sequence-specific DNA-binding transcription factor activity and DNA binding; TIR1 and GRR1 have protein-binding function acting as auxin receptors. For the case of AGO proteins, PAZ, PIWI, and ribonuclease-H domains were found as expected (Table 2).

Every target mRNA had three regions: 3'-UTR, coding sequence (CDS), and 5'-UTR. In citrus, the cleavage site of most miRNAs was usually located in the CDS of target genes (Zhang et al. 2012). Cleavage sites were located in 3'-UTR for the case of CBFA1, CBFA3, and CBFA10 and in 5'-UTR for AGO2. The rest of the predicted targets have cleavage sites inside the CDS region. No more than two mismatches were present between miRNA and target sequences, except for AGO2 and AGO7 that present seven and eight mismatches, respectively (Fig. 1). However, recent findings reveal that sequence complementarity is not the only factor that dictates the mode of action (transcript cleavage or

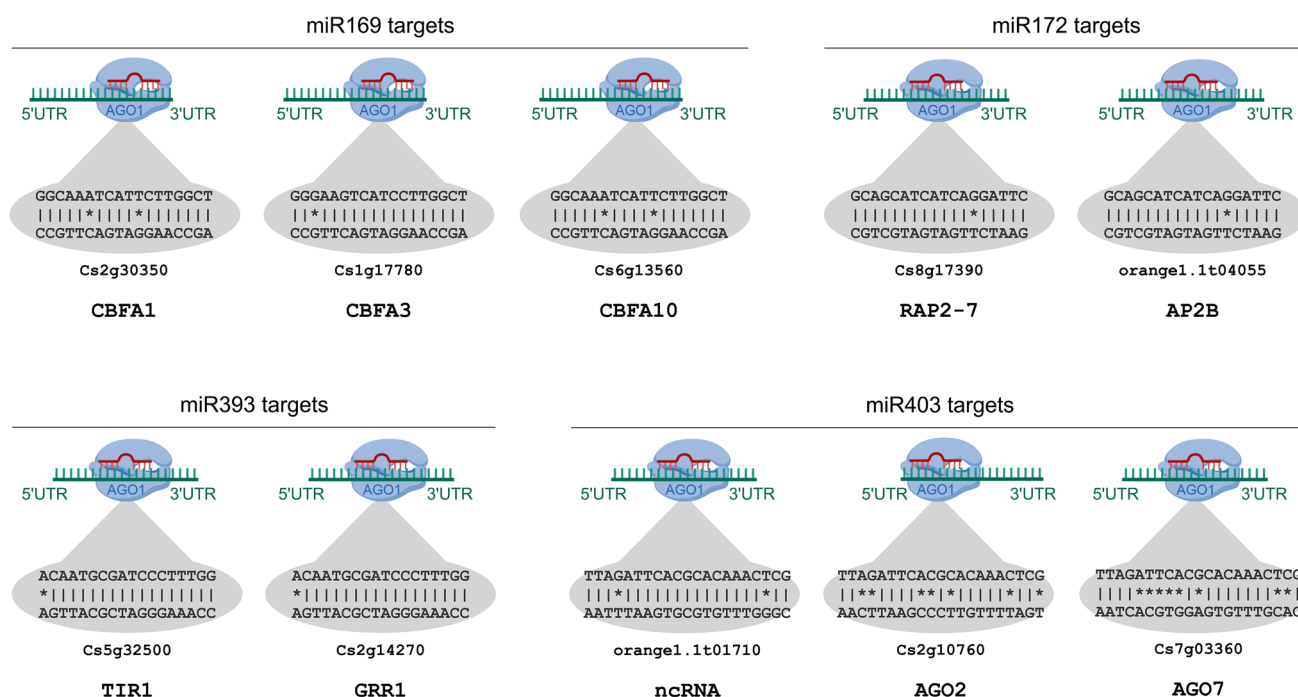


Fig. 1 Predicted *Citrus sinensis* target genes and miRNA:target complementarity. Predicted transcript targets and its sequence ID are shown. Gray bubbles show alignment of specific miRNA-predicted target mRNA duplexes. Position of the miRNA-containing AGO1

complex (miRNA in red, AGO1 in blue), on the target transcript (green) denotes the real location of the target sequence: 5'UTR, 3'UTR or CDS region

translation repression) in which plant miRNAs engage (Hou et al. 2016; Li et al. 2016; Yu et al. 2016).

Target validation through degradome analysis

To validate the predicted miRNAs targets, we analysed miRNA-cleaved mRNAs data (degradome) from *Citrus sinensis* (Liu et al. 2014). Using CleaveLand4 (Addo-Quaye et al. 2009; Brousse et al. 2014), we searched for sliced RNAs corresponding to the predicted miRNA targets using *Citrus sinensis* leaf library published by Liu et al. (2014). We selected matches with $P < 0.05$ and degradome category cutoff from 0 to 2 for a more conservative approach (Table 2 and Fig. S1). We found Cs1g17780, Cs2g30350, and Cs6g13560 corresponding to CBFA3, CBFA1, and CBFA10, respectively, are all miR169 predicted targets. Cs7g01720 (another member of the CBFA transcription factors) is also retrieved as sliced. Cs8g17390 and orange1.lt04055 were also found in leaf degradome data corresponding to RAP2-7 and AP2B, respectively, both predicted targets of miR172. Other two AP2-like ethylene-responsive family members (Cs6g04120 and Cs7g27790) were also found. Moreover, Cs2g10770 corresponding to AGO2 was found as sliced by miR403. Neither TIR1, GRR1 (miR393 predicted targets), and ncRNA (miR403 predicted target) were found in leaf degradome data. However, TIR1

was found with acceptable scores ($P = 0.047$ and degradome category cutoff = 2) in the fruit degradome data.

Expression analysis of miRNA targets and correlation with symptoms

To assess whether miRNA predicted and/or validated targets were affected in citrus plants after CPsV infection, and whether there is any association with different symptoms, we infected sweet orange seedlings with the Argentine isolate CPsV 90-1-1 or the distantly related isolate CPV4 from Texas, USA (85% nucleotide identity; Martin et al. 2006). The foliar symptoms of CPsV 90-1-1 observed in experimentally graft-inoculated plants include chlorotic flecks (Flecking; Fig. 2a) and spots on young leaves, as well as wilting and necrosis in young shoots, resulting in a progressive shock reaction (Shock; Fig. 2b). CPV4 shares foliar symptoms with CPsV 90-1-1, but does not produce the shock reaction. We designed primers for the following target genes to provide further analysis: CBFA1, CBFA3, CBFA10, AP2B, RAP2-7, TIR1, GRR1, AGO2, AGO7, and the predicted ncRNA (Table S1). RNA extracts obtained from foliar samples were subjected to RT-qPCR using two *Citrus sinensis* transcripts as internal controls: actin and ubiquitin (Fig. 2c). CBFA1 showed an up-regulation of 1.27-fold compared with the healthy control, in CPsV

Table 2 Results of degradome analysis of *Citrus sinensis* using CleaveLand4

miRNA	ID Target	Gene symbol	Degradome CATEGORY	P value	GO-InterproScan	
					Biological process	Molecular function
csi-miR169	Cs2g30350	CBFA1	0	0.0111	Regulation of transcription; DNA-templated	DNA-binding; DNA-binding transcription factor activity
csi-miR169	Cs1g17780	CBFA3	0	0.0034	Regulation of transcription; DNA-templated	DNA-binding; DNA-binding transcription factor activity
csi-miR169	Cs6g13560	CBFA10	0	0.0011	Regulation of transcription; DNA-templated	DNA-binding transcription factor activity
csi-miR 169	Cs4g05000	<i>Ubiquitin-associated/TS-N domain-containing protein</i>	0	0.032	None predicted	Protein binding
csi-miR 169	Cs7g01720	<i>Nuclear transcription factor Y subunit A-1; Transcriptional activator</i>	0	0.0015	Regulation of transcription; DNA-templated	DNA-binding; DNA-binding transcription factor activity
csi-miR 172	Cs6g04120	<i>Floral homeotic protein APETALA 2; AP2-like</i>	0	0.0467	Regulation of transcription; DNA-templated	DNA-binding; DNA-binding transcription factor activity
csi-miR 172	Cs7g27790	<i>Ethylene-responsive transcription factor RAP2-7</i>	0	0.0003	Regulation of transcription; DNA-templated	DNA-binding; DNA-binding transcription factor activity
csi-miR172	Cs8g17390	RAP2-7	0	0.0019	Regulation of transcription; DNA-templated	DNA-binding; DNA-binding transcription factor activity
csi-miR172	orange1.110	AP2B	0	0.0011	Regulation of transcription; DNA-templated	DNA-binding; DNA-binding transcription factor activity
csi-miR 393	Cs5g32500	TIR1 ^a	2	0.0468	None predicted	Protein binding
csi-miR403	Cs2g10770	AGO2	0	0.0019	None predicted	Nucleic acid binding; protein binding
csi-miR403	Cs4g19605	ncRNA	0	0.0073	None predicted	None predicted
csi-miR 393	Cs2g14270	GRR1*	None predicted	None predicted	None predicted	Protein binding
csi-miR403	orange1.1101710	ncRNA*	None predicted	None predicted	None predicted	None predicted
csi-miR403	Cs7g03360	AGO7*	None predicted	None predicted	None predicted	Nucleic acid binding; protein binding

Bold lettering indicates the hits coinciding with the prediction in leaf degradome data. Normal letters indicate extra hits with acceptable scores

*Indicate predicted targets that were not found in leaf degradome searching. ^aIndicates hit found in fruit degradome data

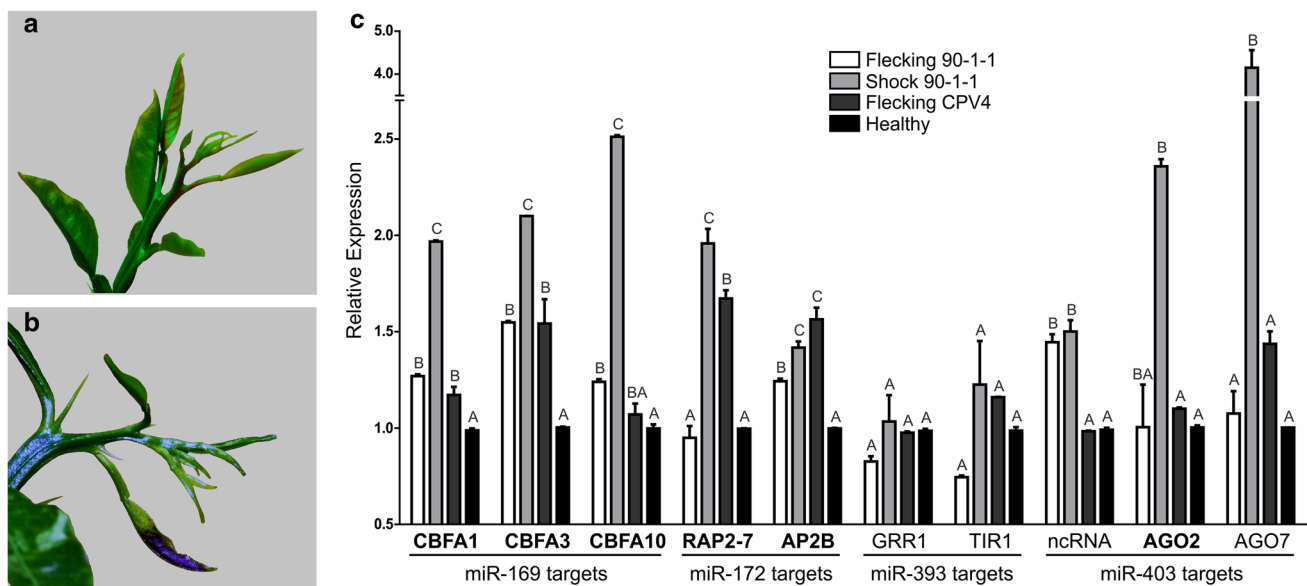


Fig. 2 Symptoms observed in *Citrus sinensis* plants infected with citrus psorosis virus (CPsV) isolates and analysis of miRNA target accumulation. **a** Flecking symptoms caused by CPsV 90-1-1 and CPV4 isolates in leaves of *C. sinensis* plants. **b** Young shoot showing Shock reaction symptoms caused only by CPsV-90-1-1, including epinasty and necrosis of the leaves. Both images were taken of plants in same developmental stage. **c** Accumulation of miRNA target transcripts in *C. sinensis* plants infected with citrus psorosis virus (CPsV) 90-1-1 or CPV4 isolate. Quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction (RT–qPCR) assays were performed to determine the expression levels of: *CCAAT-binding transcription factor subunit B* (Nuclear factor Y, subunit A1 (CBFA1), A3 (CBFA3) and A10

(CBFA10) predicted targets of miR169; *Ethylene-responsive transcription factor* (RAP2-7) and *Integrase-type DNA-binding superfamily protein* (AP2B) targets of miR172; *Transport inhibitor response 1* (TIR1) and *GRR1-like protein 1-related* (GRR1) targets of miR393; and *C. sinensis* uncharacterized orange1.1t01710 (ncRNA), *protein Argonaute 2-related* (AGO2) and *protein Argonaute 7* (AGO7) predicted targets of miR403. Mean values and standard errors of at least three independent experiments are shown. Differences among samples were tested using a one-way ANOVA (Tukey post hoc test). Different letters indicates significant differences ($P < 0.05$) between samples. Bold lettering in target names indicates degradome-validated targets

90-1-1-infected leaves expressing flecking symptoms. Samples from plants infected with the same isolate, but expressing shock reaction, accumulated about two fold higher levels of target. Similar increases resulted in the accumulation of CBFA3 transcripts from CPsV 90-1-1 infected leaves expressing flecking symptoms (1.55) and shock (2.10). The behaviour of CBFA10 was comparable to CBFA1, but shock samples showed a more striking up-regulation of 2.51-fold. RAP2-7 shows a significant up-regulation of 1.96-fold in shock samples and 1.67-fold in CPV4-infected tissue. AP2B accumulated 1.41-fold higher in shock samples and also shows significant up-regulations of 1.24- and 1.56-fold in flecking CPsV 90-1-1 and CPV4 samples, respectively, compared with healthy controls. ncRNA shows a significant up-regulation of 1.50-fold in shock samples and 1.44-fold in flecking 90-1-1 samples. AGO2 and AGO7 are significantly up-regulated (2.35- and 4.15-fold, respectively) only in shock samples. TIR1 and GRR1 show a different behaviour with no significant changes in any sample with respect to healthy.

In summary, CPsV infection up-regulates the accumulation of 8 of the 10 miRNA targets, 6 of them validated in leaf degradome searching (Fig. 2c). The results also show

a more drastic behaviour and significant differences in 7 shock samples with respect to flecking samples from the same isolate (90-1-1), with mean values of around twice the accumulation of flecking samples. CPV4 isolate generally showed lower fold changes with only significant changes in 4 targets related to healthy samples.

Discussion

Plant miRNAs most commonly exert negative regulation of their target genes via post-transcriptional cleavage or translational inhibition of target RNAs, a process that is catalyzed by the RNA-induced silencing complex (RISC) and is mediated by complementary sequences between miRNA and target gene (Tang et al. 2003; Jones-Rhoades and Bartel 2004). Many studies have demonstrated the involvement of plant miRNAs in virus infections (Bazzini et al. 2007; Tagami et al. 2007; Du et al. 2011; Chen et al. 2012; Singh et al. 2012; Xiao et al. 2014), and these virus-responsive miRNAs together with their target genes are generally associated with viral symptoms or virus pathogenicity. We previously reported that levels of a group of conserved miRNAs

previously implicated in symptom development (Bazzini et al. 2007) are reduced in *Citrus sinensis* plants infected with two different isolates of CPsV (Reyes et al. 2016).

A pre-requisite to understand miRNA function is the identification of target genes they regulate. For plant miRNAs, early bioinformatics studies were highly successful in this regard, as most known miRNAs had easily identifiable, highly complementary targets (Rhoades et al. 2002). Here, we bioinformatically predicted 10 miRNA targets corresponding to four selected *Citrus sinensis* miRNAs that were not already validated. Biological functions of the group comprise transcription factors and nucleic acid/protein binding. NFY-A proteins belonging to the CBF family of transcription factors have a considerable modularity with different subunits permitting combinatorial associations and allowing subtle adjustments in many different processes, most of them related to plant development (Lee et al. 2003; Pagnussat et al. 2005; Ballif et al. 2011; Mu et al. 2013), ABA-signalling and drought tolerance (Warpeha et al. 2007; Wen-Xue et al. 2008), and endoplasmic reticulum stress (Liu and Howell 2010). Over expression of OsHAP2E, a member of the CBF family from rice, can also confer resistance to fungal and bacterial pathogens (Alam et al. 2015). AP2B and RAP2-7 were related to floral development and ethylene response factors (Zhu and Helliwell 2011; Bahieldin et al. 2016). TIR1 and GRR1 are auxin receptor factors (Dharmasiri et al. 2005). For the case of argonaute proteins, it is well characterized their function in defence responses to viruses, particularly AGO2 (Alvarado and Scholthof 2011) but also AGO7 (Qu et al. 2008). AGO2 has an antiviral role against viruses that suppress AGO1. In effect AGO2 provides a secondary antiviral mechanism that is important when the primary AGO1-mediated layer is not active (Harvey et al. 2011). Antiviral role for *Arabidopsis* AGO2 is normally hidden in the presence of active AGO1, because the latter regulates the expression of AGO2 via the production of miR403 (Allen et al. 2005). Our results demonstrated a significant increase of AGO2 and AGO7 in infected samples showing shock symptoms with respect to the control. A putative effect of the virus over AGO1 could explain AGO2 induction. Besides, the regulation of AGO2 and AGO3 mRNAs by miR403 is specific to very few plants including *Citrus sinensis*. miR403 is absent among monocots and many eudicot lineages. Sequences are less diverse and plants have fewer isoforms of this miRNA indicating recent evolution of miR403 (Jagtap and Shivaprasad 2014). It is reported that *Citrus sinensis* has not only very high expression of miR403, but also has high AGO2 targeting ability compared to other plant species (Jagtap and Shivaprasad 2014).

There are a number of current methodologies for identification and validation of plant miRNA targets including 5'-RACE. This experimental approach allows the detection of miRNA-guided cleavage products using a PCR-based

method. However, it may not always correlate with functionally relevant miRNA regulation, as the assay is not quantitative; giving no indication of the contribution of miRNA mediated silencing to the overall regulation of the target gene. By contrast, deep-sequencing degradome approaches may be more appropriate to detect functionally relevant or strongly regulated targets. We validated here six of the ten predicted miRNA targets using public leaf degradome data from *Citrus sinensis* (Liu et al. 2014). These results prove that degradome analysis is capable of successfully validating bioinformatics predicted targets of miRNAs with a good level of accuracy and efficiency. Other non-predicted miRNA targets for the described group of miRNAs were also found during degradome search, widen the spectrum of putative regulation for each analysed miRNA.

There are some reports showing strain specific alteration of miRNAs and their targets. These changes often display a dependence on the host and correlate with symptom severity (Xu et al. 2014; Yin et al. 2018). Yin and collaborators (2018) showed that aggressive potato virus Y (PVY) strains altered a higher number of miRNAs and at a higher extent than the milder strains. Studies developed in rice also revealed some degree of correlation between target expression and symptom development. However, the patterns of expression of miRNA targets can be extremely complex and varied according to the tissue type and time point post-inoculation (Liang et al. 2019).

We demonstrated that in seven of the ten targets assessed by RT-qPCR (corresponding to the four analysed miRNAs), there were a positive correlation between transcript accumulation and symptom severity with higher levels of target accumulation in samples showing shock reaction compared with flecking samples from the same isolate. Those are the cases of the three CBFA targets of miR169, AP2B, and RAP2-7 targets of miR172 and both AGO targets of miR403, six of them coincident with degradome-validated targets. The involvement of these transcription factors in the activation of genes related to necrosis in CPsV-infected citrus plants and the possible involvement of AGO proteins in this response reaction, would be an interesting feature to assess. TIR1 and GRR1 (targets of miR393) accumulation were not significantly different in infected samples compared to healthy samples, and were not able to be validated by leaf degradome analysis raising the question of whether these predicted targets are really regulated by miR393 in *Citrus sinensis*.

Our results allow the validation of some important predicted targets from well-characterized miRNAs in *Citrus sinensis* and provide insights into the interaction of CPsV with its natural host, the citrus plant.

Author contribution statement FEM and CAR conceived and designed research. FEM and AA performed all the

experiments. MLG contributes with reagents. AR, MR, FEM, and CAR analysed the data. CAR wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements We thank Dr. Carmen Hernández Fort and Dr. Eduardo J. Peña for critical reading of the manuscript. We also thank Romina N. Ramos for help with statistical analysis and A.E. Claudio A. Gómez (Laboratorio de Protección Vegetal y Biotecnología, EEA-Concordia, INTA) for providing *Citrus sinensis* plants.

References

- Addo-Quaye C, Miller W, Axtell MJ (2009) CleaveLand: a pipeline for using degradome data to find cleaved small RNA targets. *Bioinformatics* 25(1):130–131. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn604>
- Alam MM, Tanaka T, Nakamura H, Ichikawa H et al (2015) Overexpression of a rice *heme activator protein gene* (OsHAP2E) confers resistance to pathogens, salinity and drought, and increases photosynthesis and tiller number. *Plant Biotechnol J* 13:85–96. <https://doi.org/10.1111/pbi.12239>
- Allen E, Xie Z, Gustafson AM, Carrington JC (2005) microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* 121:207–221. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.04.004>
- Alvarado VY, Scholthof HB (2011) AGO2: a new argonaute compromising plant virus accumulation. *Front Plant Sci* 2:112. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00112>
- Bahieldin A, Atef A, Edris S, Gadalla NO et al (2016) Ethylene responsive transcription factor ERF109 retards PCD and improves salt tolerance in plant. *BMC Plant Biol* 16:216. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0908-z>
- Ballif J, Endo S, Kotani M, MacAdam J, Wu Y (2011) Over-expression of *HAP3b* enhances primary root elongation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* 49:579–583. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.01.013>
- Bartel DP (2004) microRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116(2):281–297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
- Bazzini AA, Hopp HE, Beachy RN, Asurmendi S (2007) Infection and coaccumulation of tobacco mosaic virus proteins alter microRNA levels, correlating with symptom and plant development. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:12157–12162. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705114104>
- Boava LP, Cristofani-Yaly M, Mafra VS, Kubo K et al (2011) Global gene expression of *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki* and their hybrids under infection of *Phytophthora parasitica*. *BMC Genomics* 12:1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-39>
- Borniego MB, Karlin D, Pena EJ, Robles Luna G, Garcia ML (2016) Bioinformatic and mutational analysis of ophiovirus movement proteins, belonging to the 30 K superfamily. *Virology* 498:172–180. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.08.027>
- Brousse C, Liu Q, Beauclair L, Deremetz A, Axtell MJ, Bouche N (2014) A non-canonical plant microRNA target site. *Nucleic Acids Res* 42:5270–5279. <https://doi.org/10.1093/nar/gku157>
- Cardon GH, Höhmann S, Nettekheim K, Saedler H, Huijser P (1997) Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* SBP-box gene *SPL3*: a novel gene involved in the floral transition. *Plant J* 12:367–377. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.12020367.x>
- Cardon G, Höhmann S, Klein J, Nettekheim K, Saedler H, Huijser P (1999) Molecular characterisation of the *Arabidopsis* SBP-box genes. *Gene* 237(1):91–104. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00308-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00308-X)
- Chen J, Feng J, Liao Q, Chen S, Zhang J, Lang Q et al (2012) Analysis of tomato microRNAs expression profile induced by *Cucumovirus* and *Tobamovirus* infections. *J Nanosci Nanotechnol* 12(1):143–150. <https://doi.org/10.1166/jnn.2012.5112>
- Chorostecki U, Palatnik JF (2014) comTAR: a web tool for the prediction and characterization of conserved microRNA targets in plants. *Bioinformatics* 30(14):2066–2067. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu147>
- Cui LG, Shan JX, Shi M, Gao JP, Lin HX (2014) The miR156-SPL9-DFR pathway coordinates the relationship between development and abiotic stress tolerance in plants. *Plant J* 80(6):1108–1117. <https://doi.org/10.1111/tpj.12712>
- Dai X, Zhao PX (2011) psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Res* 39:W155–W159. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr319>
- Dangl JL, Horvath DM, Staskawicz BJ (2013) Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science* 341:746–751. <https://doi.org/10.1126/science.1236011>
- Danós E (1990) La psorosis de los cítricos: la epidemia en curso en Argentina y el desafío de su control. En *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, International Foundation for Science (IFS) e Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) edn: pp 265–277
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Weijers D, Lechner E et al (2005) Plant development is regulated by a family of auxin receptor F-box proteins. *Dev Cell* 9:109–119. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.05.014>
- Dodds PN, Rathjen JP (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet* 11:539–548. <https://doi.org/10.1038/nrg2812>
- Du Z, Xiao D, Wu J, Jia D, Yuan Z et al (2011) p2 of rice stripe virus (RSV) interacts with OsSGS3 and is a silencing suppressor. *Mol Plant Pathol* 12(8):808–814. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00716.x>
- García ML, Derrick KS, Grau O (1993) Citrus psorosis associated virus and citrus ringspot virus belong to a new virus group. In: Moreno P, da Graça JV, Timmer LW (eds) *Proc 12th conference intern organization of citrus virologists*. IOCV, University of California, Riverside, pp 430–431
- García ML, Bo ED, da Graça JV, Gago-Zachert S et al (2017) ICTV virus taxonomy profile: ophioviridae. *J Gen Virol* 98:1161–1162. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000836>
- Garnsey SM, Timmer LW (1980) Mechanical transmissibility of citrus ringspot virus isolates from Florida, Texas, and California. In: Calavan EC, Garnsey SM, Timmer LW (eds) *Proc 8th conference intern organization of citrus virologists*. IOCV, Riverside, pp 174–179
- Garnsey SM, Youtsey CO, Bridges GD, Burnett HC (1976) A necrotic ringspot-like virus found in a ‘Star Ruby’ grapefruit tree imported without authorization from Texas. *Proc Fla State Hort Soc* 89:63–67
- Gómez CA (2019) Metodologías de diagnóstico de CPsV (psorosis) en cítricos. (3200). https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_concordia_metodologia_de_diagnostico_de_psorosis_en_citricos.pdf. Accessed 20 Nov 2019
- Harvey JJW, Lewsey MG, Patel K, Westwood J et al (2011) An antiviral defense role of AGO2 in plants. *PLoS One* 6(1):e14639. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014639>
- Hou C, Lee W, Chou H, Chen A, Chou S, Chen H (2016) Global analysis of truncated RNA ends reveals new insights into ribosome stalling in plants. *The Plant Cell* 28:2398–2416. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00295>
- Jagtap S, Shivaprasad PV (2014) Diversity, expression and mRNA targeting abilities of Argonaute-targeting miRNAs among

- selected vascular plants. *BMC Genomics* 15(1):1049. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1049>
- Jin D, Wang Y, Zhao Y, Chen M (2013) microRNAs and their cross-talks in plant development. *J Gen Genomics* 40:161–170. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2013.02.003>
- Jones P, Binns D, Chang HY, Fraser M et al (2014) InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics* 30:1236–1240. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu031>
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell* 14:787–799
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B (2006) microRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol* 57:19–53. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105218>
- Khraiwesh B, Zhu JK, Zhu J (2012) Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *BiochimBiophys Acta* 1819:137–148. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.05.001>
- Klein J, Saedler H, Huijser P (1996) A new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the *Antirrhinum majus* floral meristem identity gene *Squamosa*. *Mol Gen Genet* 250(1):7–16. <https://doi.org/10.1007/bf02191820>
- Langmead B (2010) Aligning short sequencing reads with Bowtie. *Curr Protoc Bioinform* 11:11–17. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1107s32>
- Lee H, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (2003) *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 represents a functionally specialized subunit of the CCAAT binding transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2152–2156. <https://doi.org/10.1073/pnas.0437909100>
- Li WX, Oono Y, Zhu J, He XJ et al (2008) The *Arabidopsis* NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and post-transcriptionally to promote drought resistance. *Plant Cell* 20:2238–2251. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.059444>
- Li S, Le B, Ma X, Li S, You C et al (2016) Biogenesis of phased siRNAs on membrane-bound polysomes in *Arabidopsis*. *ELife* 5:e22750. <https://doi.org/10.7554/elife.22750>
- Liang C, Liu H, Hao J, Li J, Luo L (2019) Expression profiling and regulatory network of cucumber microRNAs and their putative target genes in response to cucumber green mottle mosaic virus infection. *Arch Virol* 164:1121–1134. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04152-w>
- Liu JX, Howell SH (2010) Endoplasmic reticulum protein quality control and its relationship to environmental stress responses in plants. *Plant Cell* 22:2930–2942. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.078154>
- Liu Y, Wang L, Chen D, Wu X et al (2014) Genome-wide comparison of microRNAs and their targeted transcripts among leaf, flower and fruit of sweet orange. *BMC Genomics* 15(1):695. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-695>
- Martin S, Garcia ML, Troisi A, Rubio L et al (2006) Genetic variation of populations of citrus psorosis virus. *J Gen Virol* 87:3097–3102. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81742-0>
- Mu J, Tan H, Hong S, Liang Y, Zuo J (2013) *Arabidopsis* transcription factor genes NF-YA1, 5, 6, and 9 play redundant roles in male gametogenesis, embryogenesis, and seed development. *Mol Plant* 6:188–201. <https://doi.org/10.1093/mp/sss061>
- Naum-Onganía G, Gago-Zachert S, Peña EJ et al (2003) Citrus psorosis virus RNA 1 is of negative polarity and potentially encodes in its complementary strand a 24 K protein of unknown function and 280 K putative RNA dependent RNA polymerase. *Virus Res* 96:49–61. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(03\)00172-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(03)00172-2)
- Padmanabhan MS, Ma S, Burch-Smith TM, Czymmek K et al (2013) Novel positive regulatory role for the SPL6 transcription factor in the N TIR-NB-LRR receptor-mediated plant innate immunity. *PLoS Pathog* 9:e1003235. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003235>
- Pagnussat GC, Yu HJ, Ngo QA, Rajani S et al (2005) Genetic and molecular identification of genes required for female gametophyte development and function in *Arabidopsis*. *Development* 132:603–614. <https://doi.org/10.1242/dev.01595>
- Peña EJ, Robles Luna G, Zaneck MC, Borniego MB et al (2012) Citrus psorosis and mirafiori lettuce big-vein ophiovirus coat proteins localize to the cytoplasm and self interact in vivo. *Virus Res* 170:34–43. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.08.005>
- Qu F, Ye X, Morris TJ (2008) *Arabidopsis* DRB4, AGO1, AGO7 and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:14732–14737. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805760105>
- Reyes CA, Ocolotobiche EE, Marmisolle FE, Robles Luna G et al (2016) *Citrus psorosis virus* 24 K protein interacts with citrus miRNA precursors, affects their processing and subsequent miRNA accumulation and target expression. *Mol Plant Pathol* 17(3):317–329. <https://doi.org/10.1111/mpp.12282>
- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel DP (2002) Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110(4):513–520. <https://doi.org/10.1016/S0092867402008632>
- Robles Luna G, Peña EJ, Borniego MB, Heinlein M, García ML (2013) Ophioviruses CPsV and MiLBVV movement protein is encoded in RNA 2 and interacts with the coat protein. *Virology* 441(2):152–161. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.03.019>
- Robles Luna G, Reyes CA, Peña EJ, Ocolotobiche E et al (2017) Identification and characterization of two RNA silencing suppressors encoded by ophioviruses. *Virus Res* 235:96–105. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.04.013>
- Robles Luna G, Peña EJ, Borniego MB, Heinlein M, García ML (2018) Citrus psorosis virus movement protein contains an aspartic protease required for autocleavage and the formation of tubule-like structures at plasmodesmata. *J Virol* 92(21):1–18. <https://doi.org/10.1128/jvi.00355-18>
- Roistacher CN (1991) Graft-transmissible diseases of citrus: Handbook for detection and diagnosis. Rome: International Organization of Citrus Virologists. Food and Agriculture Organization of the United Nations
- Roistacher CN (1993) Psorosis—a review. 12th Conf International Organisation of Citrus Virologists. IOCVR, Riverside, pp 139–162
- Singh K, Talla A, Qiu W (2012) Small RNA profiling of virus-infected grapevines: evidences for virus infection-associated and variety-specific miRNAs. *Funct Integr Genomics* 12:659–669. <https://doi.org/10.1007/s10142-012-0292-1>
- Song C, Jia Q, Fang J, Li F, Wang C, Zhang Z (2010a) Computational identification of citrus microRNAs and target analysis in citrus expressed sequence tags. *Plant Biol* 12:927–934. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2009.00300.x>
- Song C, Wang C, Zhang C, Korir NK et al (2010b) Deep sequencing discovery of novel and conserved microRNAs in trifoliate orange (*Citrus trifoliata*). *BMC Genomics* 11:431. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-431>
- Tagami Y, Inaba N, Kutsuna N, Kurihara Y, Watanabe Y (2007) Specific enrichment of miRNAs in *Arabidopsis thaliana* infected with tobacco mosaic virus. *DNA Res* 14:227–233. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsm022>
- Tang G, Reinhart BJ, Bartel DP, Zamore PD (2003) A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev* 17:49–63. <https://doi.org/10.1101/gad.1048103>
- Tong A, Yuan Q, Wang S, Peng J et al (2017) Altered accumulation of osa-miR171b contributes to rice stripe virus infection by regulating disease symptoms. *J Exp Bot* 68:4357–4367. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx230>
- Voinnet O (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* 136:669–687. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.046>

- Wang A (2015) Dissecting the molecular network of virus-plant interactions: the complex roles of host factors. *Annu Rev Phytopathol*. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120001>
- Warpeha KM, Upadhyay S, Yeh J, Adamiak J et al (2007) The GCR1, GPA1, PRN1, NF-Y signal chain mediates both blue light and abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 143:1590–1600. <https://doi.org/10.1104/pp.106.089904>
- Wu XM, Liu MY, Xu Q, Guo WW (2010) Identification and characterization of microRNAs from citrus expressed sequence tags. *Tree Gen Genome* 7:117–133. <https://doi.org/10.1007/s11295-010-0319-5>
- Xiao B, Yang X, Ye CY, Liu Y et al (2014) A diverse set of miRNAs responsive to begomovirus-associated betasatellite in *Nicotiana benthamiana*. *BMC Plant Biol* 14(1):60. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-60>
- Xu Q, Chen LL, Ruan X, Chen D et al (2013) The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nat Genet* 45:59–66. <https://doi.org/10.1038/ng.2472>
- Xu D, Mou G, Wang K, Zhou G (2014) microRNAs responding to southern rice black-streaked dwarf virus infection and their target genes associated with symptom development in rice. *Virus Res* 190:60–68. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.07.007>
- Yin Z, Murawska Z, Xie F, Pawelkiewicz M et al (2018) microRNA response in potato virus Y infected tobacco shows strain-specificity depending on host and symptom severity. *Virus Res* 260:20–32. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.11.002>
- Yu X, Willmann MR, Anderson SJ, Gregory BD (2016) Genome-wide mapping of uncapped and cleaved transcripts reveals a role for the nuclear mRNA 5' cap-binding complex in co-translational RNA decay in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 28:2385–2397. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00456>
- Zanek MC, Peña EJ, Reyes CA, Figueroa J et al (2006) Detection of citrus psorosis virus in the northwestern citrus production area of Argentina by using an improved TAS-ELISA. *J Virol Methods* 137:245–251. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.06.021>
- Zhang JZ, Ai XY, Guo WW, Peng SA et al (2012) Identification of miRNAs and their target genes using deep sequencing and degradome analysis in trifoliate orange [*Poncirus trifoliata* L. Raf] [corrected]. *Mol Biotechnol* 51:44–57. <https://doi.org/10.1007/s12033-011-9439-x>
- Zhu QH, Helliwell CA (2011) Regulation of flowering time and floral patterning by miR172. *J Exp Bot* 62:487–495. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq295>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.